

LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA MOLECULAR DE PROTEÍNAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

EVALDO VITOR PEREIRA

Determinação da atividade e da estabilidade termodinâmica da isoforma α -tripsina bovina em meios aquo-orgânicos.

Vitória

2015

EVALDO VITOR PEREIRA

**Determinação da atividade e da estabilidade termodinâmica da isoforma
 α -tripsina bovina em meios aquo-orgânicos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos.

Coorientador: Profa. Dra. Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves

Vitória

2015

EVALDO VITOR PEREIRA

Determinação da atividade e da estabilidade termodinâmica da isoforma α -tripsina bovina em meios aquo-orgânicos.

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia, da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, em 24 de fevereiro de 2015.

Apresentada à Comissão Examinadora, integrada pelos Professores:

Prof. Dr. Marcelo Porto Bemquerer
Membro Externo

Prof. Dra. Patrícia Machado Bueno Fernandes
Membro Externo

Profa. Dra. Rita Gomes Wanderley Pires
Membro Interno

Profa. Dra. Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves
Co-orientador:

Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos
Orientador

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

P436d Pereira, Evaldo Vitor, 1971 -
Determinação da atividade e da estabilidade termodinâmica
da isoforma α -tripsina bovina em meios aquo-orgânicos / Evaldo
Vitor Pereira – 2015.
71 f. : il.

Orientador: Alexandre Martins Costa Santos.

Coorientador: Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Solventes. 2. Ativação Enzimática. 3. Estabilidade
Proteica. I. Santos, Alexandre Martins Costa. II. Gonçalves,
Juliana Barbosa Coitinho. III. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Vitória, 24 de fevereiro de 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS** Criador e mantenedor do universo, pela vida, saúde, força e amparo nos momentos de angústia.

Aos meus pais, **Ana Pinto** e **José Condessa Pereira** pelo amor, ensino, compreensão e palavras de incentivo. A minha amada esposa, **Cristiane Barros Coutinho Pereira**, pelo amor, carinho, companheirismo e dedicação. A minha filha, **Esther Condessa Coutinho**, pelo lindo sorriso e alegria que me serve como estímulo.

Ao professor **Dr. Alexandre Martins Costa Santos**, pela orientação na qual tornou possível a realização deste trabalho. Agradeço à disposição em ensinar, compartilhar conhecimento, do agir como pessoa e profissional de forma honesta e humana.

A Co-orientadora professora **Dra. Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves**, pela colaboração, incentivo e com a forma tranquila de ensinar.

Aos alunos de iniciação científica **Antônio Victor Vasconcelos** e **Silvana Fontoura** pela parceria na realização deste estudo.

A **Jamil Silvano**, técnico do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas da UFMG pela colaboração com este projeto.

A **Universidade federal do Espírito Santo**, direção, corpo docente, corpo técnico administrativo que oportunizaram o cumprimento de mais uma fase desta minha vida.

Aos demais que de alguma forma contribuíram para realização deste projeto.

Talvez falem adjetivos para expressar toda minha gratidão, mas a todos os citados meus sinceros **agradecimentos**.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Enzimas em sistemas aquo-orgânicos.....	13
1.2	Enzimas em solventes orgânicos.....	14
1.3	Serino proteases	16
1.3.1	Características das serino proteases.....	16
1.3.2	Mecanismo catalítico das serino proteases.....	17
1.3.3	Ativação do tripsinogênio e formação das isoformas de tripsina.....	19
1.3.4	Estruturas secundária e terciária	22
1.4	Fatores que influenciam a atividade enzimática.....	23
1.5	Termodinâmica e estabilidade de proteínas.....	24
2	JUSTIFICATIVA	27
3	HIPÓTESE	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Materiais.....	29
4.2	Purificação das isoformas de tripsina.....	29
4.2.1	Determinação da massa molecular das isoformas de tripsina e pureza da α -tripsina por espectrometria de massa	29
4.3	Efeito da concentração de solvente orgânico na atividade enzimática da α -tripsina	30
4.4	Efeito da concentração de solvente orgânico na estabilidade conformacional da α -tripsina medido por espectroscopia de varredura UV-VIS.....	31
4.5	Efeito da concentração de CaCl_2 na atividade enzimática da α -tripsina em sistema aquo-orgânico.....	32
4.5.1	Cálculo do coeficiente de extinção molar (ϵ) para 4-nitroanilina.....	33

4.6	Ensaio da estabilidade térmica da α -tripsina em função do tempo e temperatura em sistema aquo-orgânico.	34
4.7	Estudo de desnaturação térmica da α -trpsina em sistema aquo-orgânico...	34
4.7.1	Cálculos dos parâmetros termodinâmicos	35
4.7.2	Índice de cooperatividade (CI)	37
4.8	Determinação de parâmetros cinéticos da α -tripsina em pH 8,0.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
5.1	Purificação da isoforma α -tripsina	39
5.2	Determinação da pureza por espectrometria de massas	40
5.3	Efeito da concentração de solventes orgânicos na atividade amidásica da α -tripsina.	42
5.4	Efeito da concentração do etanol na estabilidade conformacional da α -tripsina a 25 °C.	47
5.5	Efeito do CaCl_2 na atividade amidásica da α -tripsina no sistema aquoso e etanol-aquoso 60% v/v.	50
5.6	Estabilidade térmica da α -tripsina em sistema etanol-tampão 60% v/v.	54
5.7	Estudo termodinâmico da α -tripsina em sistema aquo-orgânico por espectroscopia no UV.....	56
5.8	Estudo cinético da α -tripsina em sistema tampão e etanol-tampão 60% v/v a 25 °C.....	60
6	CONCLUSÃO	63
7	PERSPECTIVAS.....	64
8	REFERÊNCIAS.....	65

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Superposição estrutural de cinco serino proteases e de seus sítios ativos	16
Figura 2: Mecanismo catalítico das serina proteases.....	18
Figura 3: Esquema de conversão de tripsinogênio nas isoformas de tripsina.....	19
Figura 4: Pontos de clivagem na conversão de tripsinogênio para as isoformas ativas de tripsina bovina	21
Figura 5: Estrutura tridimensional de β -tripsina bovina.	23
Figura 6: Cromatograma de troca catiônica de tripsina comercial bovino	39
Figura 7: Espectrometria de massa da α -tripsina.....	41
Figura 8: Atividade da isoforma α -tripsina em função da concentração de solvente orgânico	43
Figura 9: Posição dos resíduos aromáticos da β -tripsina.....	47
Figura 10: Monitoramento da variação da absorção de resíduos aromáticos da isoforma α -tripsina em função da concentração de etanol..	49
Figura 11: Cálculo do coeficiente de extinção molar da 4-nitroanilina em sistema tampão e tampão-etanol 60% v/v	51
Figura 12: Atividade amidásica específica da α -tripsina em função da adição de CaCl_2 em meio aquoso e em etanol-tampão 60% v/v..	52
Figura 13: Série de Hofmeister.....	53
Figura 14: Atividade amidásica da α -tripsina em função do tempo e temperatura... ..	55
Figura 15: Curva de desnaturação térmica de α -tripsina em tampão e em metanol, etanol e propanol.....	57
Figura 16: Cinética enzimática da α -tripsina em tampão e etanol-tampão 60% v/v. .	61
Figura 17: Esquema de inibição não competitiva	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros C_m , PTS e CI obtidos da curva de desnaturação por indução química a 37 °C.....	44
Tabela 2: Parâmetros físico-químicos obtidos do Handbook	45
Tabela 3: Parâmetros termodinâmicos α -tripsina em pH 3,0	58
Tabela 4: Parâmetros cinéticos da α -tripsina em etanol-tampão 60% v/v a 25°C	61

LISTA DE ABREVIATURAS

BApNA – N- α -Benzoil-DL-arginina-4-nitroanilina.

CI - Índice de cooperatividade.

C_m - Concentração percentual v/v de solvente orgânico na qual a proteína apresenta 50% da sua atividade.

DMSO - Dimetilsulfóxido.

DSC - Differential Scanning Calorimetry ou Calorimetria Diferencial de varredura.

MALDI-ToF - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation ou Ionização e dessorção a laser assistida por matriz acoplada a detector de tempo de voo.

k_{cat} - constante catalítica.

K_M - Constante de Michaelis.

MS - Espectrometria de massas.

m/z - relação massa carga.

nm - Nanômetro .

PDB - Protein Data Bank, banco de dados de estruturas e sequência de proteínas.

Spacefill - é um modelo molecular tridimensional, onde os átomos são representadas por esferas cujos raios são proporcionais ao raio dos átomos.

T_m - Temperatura na qual a proteína tem sua estrutura desnaturada em 50 % a quente.

TRIS - tris (hidroximetil) aminometano.

UV – Ultra-Violeta.

ΔC_p - Variação da capacidade calorífica entre estados organizados e desorganizados.

ΔG - Variação de energia livre. de Gibbs.

ΔH - Variação de entalpia.

ΔH_{cal} - Variação de entalpia quando uma molécula desnatura, calculada pela integral da área da curva de $C_p \times T$.

ΔH_{vH} - Descreve a dependência da constante de equilíbrio (K) em função da temperatura.

V_{max} - Velocidade máxima.

RESUMO

A isoforma α -tripsina bovina foi purificada a partir de amostras comerciais por cromatografia de troca iônica catiônica. A pureza desta amostra foi confirmada por MALDI-ToF cujo valor foi de 23.312 Da. Essa isoforma da tripsina foi submetida a diferentes concentrações de monoalcoóis e DMSO e esta foi capaz de manter a metade de sua atividade em 60% v/v de etanol-tampão. Por essa capacidade outros testes subsequentes foram realizados a fim de entender melhor este processo. O efeito de íons Ca^{2+} e Cl^- estabilizou a α -tripsina em até 20 mmol.L^{-1} , tanto no sistema aquoso quanto no sistema etanol-tampão, contudo acima desta concentração estes íons passaram a desestabilizar a molécula proteica influenciando na diminuição da sua atividade catalítica. Entretanto a estrutura da α -tripsina monitorada por espectroscopia UV nos resíduos aromáticos, com adição de até 80% v/v de etanol permaneceu como na forma nativa. Um teste de cinética comparando a atividade da α -tripsina em tampão e etanol-tampão mostrou que o etanol funcionou como inibidor não competitivo. Entretanto, nos testes de termodinâmica utilizando a técnica de monitoramento do resíduo aromático Tyr a 285 nm, mostrou que na série de monoalcoóis apenas o n-propanol contribuiu de forma significativa na diminuição do T_m em comparação com os demais alcoóis e sistema tampão. Finalmente podemos concluir que o sistema solvente orgânico diminui a atividade enzimática de duas maneiras: atuando como inibidor não competitivo e provocando alterações irreversíveis nas proteínas diminuindo o número de moléculas disponíveis para realizar catálise.

Palavras chaves: α -tripsina, solvente orgânico, físico-química, atividade enzimática, estabilidade de proteínas.

ABSTRACT

Bovine α -trypsin isoform was purified from commercial samples by cationic ion exchange chromatography. The purity of this sample was confirmed by MALDI-ToF and the value found was 23,312 Da. Trypsin was subjected to different concentrations of mono alcohols and DMSO and it was able to keep half of its activity in 60% v/v ethanol-buffer. Due this capacity, other subsequent tests were performed in order to a better understanding of this process. The effect of Ca^{2+} and Cl^- ions stabilized α -trypsin till 20 mmol.L⁻¹, in both aqueous and ethanol-buffer systems, however above this concentration, these ions tend to destabilize the protein molecule influencing the reduction in its catalytic activity. However, the structure of α -trypsin monitored by UV spectroscopy on the aromatic residues, with addition of 80% v / v ethanol, remained as in native form. A kinetic test comparing the α -trypsin activity in ethanol-buffer and buffer showed that ethanol act as a non-competitive inhibitor. However, in thermodynamic assay using the monitoring technique aromatic residue, Tyr at 285 nm, showed that only n-propanol, in the series of monoalcohols, contributed significantly to decrease the T_m as comparing to with other alcohols and buffer system. Finally, we can conclude that the organic solvent system decreases the enzymatic activity of two ways: by acting as non-competitive inhibitor and causing irreversible changes in the protein by decreasing the number of molecules available to perform catalysis.

Keywords: α -trypsin, organic solvent, physical chemistry, enzymatic activity, protein stability.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Enzimas em sistemas aquo-orgânicos.

As propriedades solventes da água resultam das forças atrativas (ligações de hidrogênio) que existem entre as suas moléculas. A molécula de água e seus produtos de ionização, H^+ e OH^- , influenciam profundamente a estrutura e as propriedades das moléculas dissolvidas nesse solvente (LIMA; AGNES, 1999).

As biomoléculas polares dissolvem-se facilmente na água pois podem substituir as interações moleculares água-água, energeticamente favoráveis, por interações do tipo ligações de hidrogênio e eletrostáticas, ainda mais favoráveis, no sistema água-soluto. A variação da entalpia (ΔH) pela dissolução desses solutos é, geralmente, pequena (LIMA; AGNES, 1999).

Diferentemente, moléculas apolares interferem com as interações água-água e são muito pouco solúveis nesse solvente (hidrofóbicas). Estas moléculas apolares tendem, quando em solução aquosa, a agregarem-se de forma a minimizar os efeitos energeticamente desfavoráveis (diminuição da entropia do sistema) provocados pela sua presença (KUMAR; VENKATESU, 2012).

As enzimas proteicas, que são catalisadores biológicos importantes, precisam de água em pequenas quantidades para se enovelar e manter sua conformação catalítica ativa, mas há casos em que algumas centenas de moléculas de água são necessárias para a atividade de algumas proteínas (KLIBANOV, 1989).

Entretanto, fora do ambiente puramente aquoso, a atividade pode se alterar. Segundo Gorman e Dordick (1992a), os solventes afetam a atividade por interação direta com a água essencial em torno da enzima. Solventes altamente polares são capazes de absorver água avidamente e retirar a “camada mais íntima de hidratação” da enzima, provocando perda das propriedades catalíticas por inativação ou desnaturação. Apesar desta concha de hidratação ser muitas vezes interpretada como uma “camada”, esta não deve não deve ser interpretada literalmente. A proteína apresenta uma cinética de movimentação complexa e influenciada por diversos fatores (TAREK; TOBIAS, 2000) A distribuição de água no microambiente da enzima ou nas partes mais externas da proteína é mais complexa. Para

proporcionar a atividade máxima em meios não aquosos, a água deve ocupar posições específicas dentro da molécula da proteína. Um aumento de oito vezes na atividade catalítica foi observado após exposição da subtilisina à irradiação ultrassônica na presença de vários alcoóis (VULFSON; SARNEY; LAW, 1991). Aparentemente, o processo de sonicação resultou na redistribuição de moléculas de água na molécula de subtilisina, impedindo assim, a formação de “reservatórios de água” ao redor da enzima.

Por sua vez, os solventes hidrofóbicos em geral, por serem menos capazes de arrastar para fora ou deformar a camada de hidratação, podem afetar parcialmente a atividade catalítica. Gorman e Dordick (1992a) observaram, por meio de medidas radiométricas utilizando água tritiada (T_2O) como sonda, que o metanol puro adsorve cerca de 60% da água tritiada ligada à subtilisina ou à α -quimotripsina (essas enzimas foram liofilizadas e ressuspensas nestes solventes), enquanto o hexan-1-ol puro adsorve apenas cerca de 0,5%.

Para entender melhor esse comportamento, Khmelnitsky e col (1991a) observaram que quando a α -quimotripsina foi covalentemente modificada com di-anidrido piromelítico, ela apresentou um aumento da resistência à desnaturação induzida por solvente: metade da inativação da enzima não modificada ocorre em metanol 32% v/v, enquanto que, para a enzima modificada, essa inativação ocorre apenas com metanol a 54% v/v. Esses pesquisadores sugeriram que o aumento da hidrofilicidade da superfície de uma enzima via modificação química ajuda a manter água no microambiente da enzima. Um efeito oposto foi observado na presença de certos hidratos de carbono que atuam para reduzir a atividade da água na vizinhança da enzima (SANCHEZ-MONTERO et al., 1991).

1.2 Enzimas em solventes orgânicos.

O uso de solvente orgânico pode ser vantajoso para melhorar a solubilidade dos substratos hidrofóbicos. Entretanto, enzimas apresentam redução significativa de sua flexibilidade em meio orgânico em relação ao meio aquoso (KLIBANOV, 1989) e (GORMAN; DORDICK, 1992). Isso ocorre porque a constante dielétrica da água é geralmente maior que a dos solventes orgânicos, as forças de interações

eletrostáticas entre os resíduos de aminoácidos carregados são maiores em meio orgânico que em água. Vários estudos têm ajudado a quantificar a relação entre flexibilidade da enzima e constante dielétrica (FITZPATRICK; KLIBANOV, 1991), assim como, flexibilidade da enzima e atividade catalítica (DORDICK, 1991) e (KLIBANOV, 1989)

O grau de flexibilidade da enzima pode ser influenciado pelo controle preciso do meio de hidratação e pela seleção do solvente. Para investigar o papel da água no sítio ativo da enzima, Affleck e col (1992) utilizando a técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética, submeteram a subtilisina a diferentes níveis de hidratação com tetrahidrofurano: adicionando 0,5% de água ao sistema enzima-tetrahidrofurano a eficiência catalítica da transesterificação aumentou em seis vezes. Esse aumento na atividade foi acompanhado pelo aumento na flexibilidade do sítio ativo, assim como na diminuição da polaridade do sítio ativo.

Para solventes miscíveis, quando não há limite de solubilidade, tem sido demonstrado que há um valor onde a concentração do solvente orgânico inicia a inativação (MOZHAEV VADIM et al., 1989), (KHMELNITSKY et al., 1991b). Quando enzimas são colocadas em solventes orgânicos, elas tornam-se mais rígidas, o que resulta, por exemplo, no aumento da termoestabilidade (KLIBANOV, 1989).

Volkin e col (1991) demonstraram que a resistência térmica de enzimas na presença de solventes anidros aumenta com a hidrofobicidade do solvente. Essa resistência à desnaturação térmica deve-se ao aumento da rigidez provocada pelo solvente que resulta na retenção da “impressão” do sítio ativo em que anteriormente havia ligantes. Essas configurações artificiais do sítio ativo proporcionam maior atividade e especificidade para substratos incomuns (KLIBANOV, 1989) e (DORDICK, 1991).

Ainda em relação à influência de solventes orgânicos na atividade enzimática, Stahl e col. (STAHL et al., 1991) relataram uma estereoseletividade e seletividade induzida na α -quimotripsina pelo seu substrato quando na presença de solventes orgânicos anidros, no entanto, suas propriedades catalíticas foram perdidas ao introduzir água no meio. Também foi constatado que essas “impressões” aparentemente desapareceram num certo limite de flexibilidade da enzima induzida pela hidratação.

1.3 Serino proteases

1.3.1 Características das serino proteases.

Dentre os diversos tipos de proteases, as serino proteases são, provavelmente, as mais cuidadosamente investigadas. A tripsina, quimotripsina, elastase e trombina, que são serino proteases, fazem parte da superfamília das enzimas homólogas da quimotripsina (Figura 1). Essas enzimas apresentam dois domínios similares, provavelmente originados por meio de duplicação gênica divergente contendo a tríade catalítica e a fenda oxaniônica em seu centro ativo (LESK; FORDHAM, 1996; LESK, 2001).

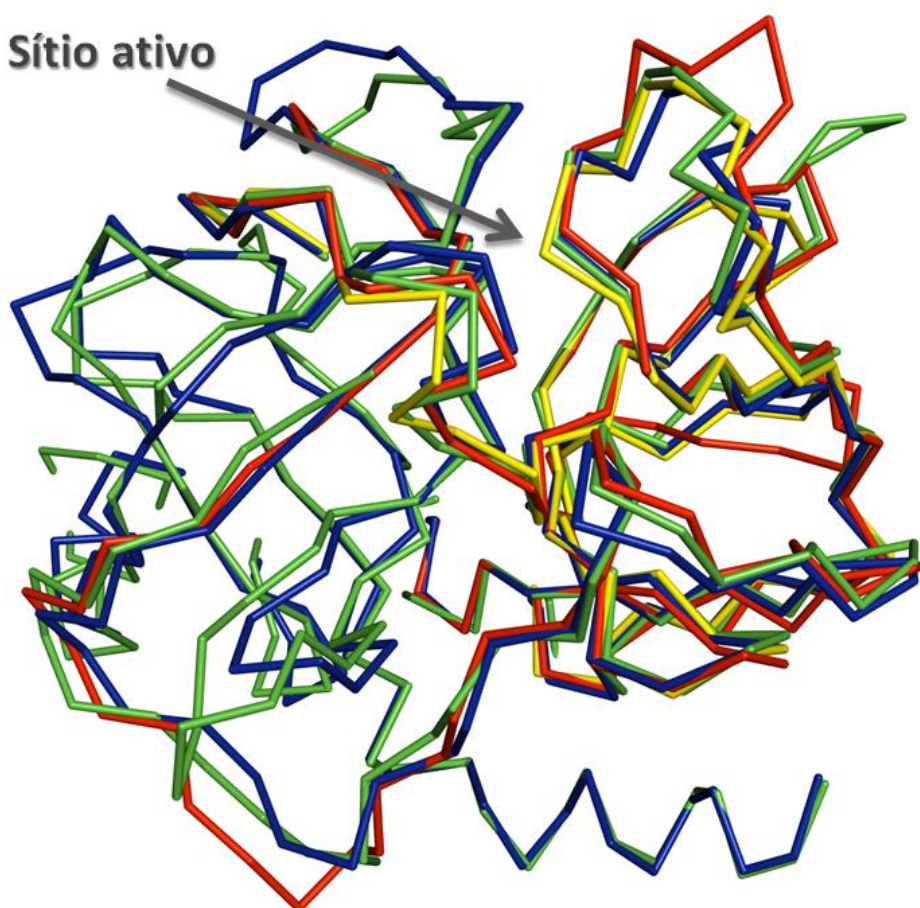


Figura 1: Superposição estrutural de quatro serino proteases e de seus sítios ativos nas respectivas enzimas: tripsina bovina - 5PTP (azul), quimotripsina bovina - 2CHA (vermelho), elastase porcina - 3EST (verde) e caliceína porcina - 2PKA (amarelo).

Vários processos fisiológicos são relacionados às atividades dessas enzimas como, por exemplo, a digestão (BARRETT, 1970), a coagulação sanguínea (DAVIE; FUJIKAWA; KISIEL, 1991), a fertilização (BABA et al., 1989) e outros. Essas enzimas estão presentes em vários organismos como vírus, bactérias, plantas e animais (LESK; FORDHAM, 1996; LESK, 2001).

1.3.2 Mecanismo catalítico das serino proteases.

Estas enzimas empregam a catálise ácido-básica geral e a catálise covalente para a sua ação, onde o mecanismo catalítico inicia-se na tríade catalítica característica, His⁵⁷ - Asp¹⁰² - Ser¹⁹⁵ (segundo a numeração do tripsinogênio), que está localizada no sítio ativo da enzima (Figura 2).

Na etapa (1) a serino protease se liga a um substrato formando um complexo de Michaelis, a Ser¹⁹⁵, na etapa que determina a velocidade de reação, faz um ataque nucleofílico no grupo carbonila suscetível de hidrólise do peptídeo, formando um complexo conhecido como intermediário tetraédrico (catálise covalente). O anel imidazólico da His⁵⁷ recebe o próton que foi liberado, formando assim um íon imidazólico. Esse processo é ajudado pelo efeito polarizador do íon carboxilato não solvatado do Asp¹⁰², que está ligado por ligação de hidrogênio à His⁵⁷.

Na etapa (2) o intermediário tetraédrico decompõe-se para um intermediário acil-enzima sob a força da doação do próton do N3 da His⁵⁷ (catálise ácida geral). O grupo de saída amino (R'NH₂, a nova porção N-terminal da cadeia polipeptídica clivada) é liberado da enzima e substituído por água do solvente.

Na etapa (3 e 4) o intermediário acil-enzima (que, na ausência de enzima, seria um composto estável) é desacilado rapidamente pelo que, essencialmente, é o inverso das etapas anteriores, liberando o produto carboxilato (a nova porção C-terminal da cadeia polipeptídica clivada) e regenerando a enzima ativa. Nesse processo, a água é o nucleófilo atacante e a Ser¹⁹⁵ é o grupo de saída (VOET; VOET, 2013).

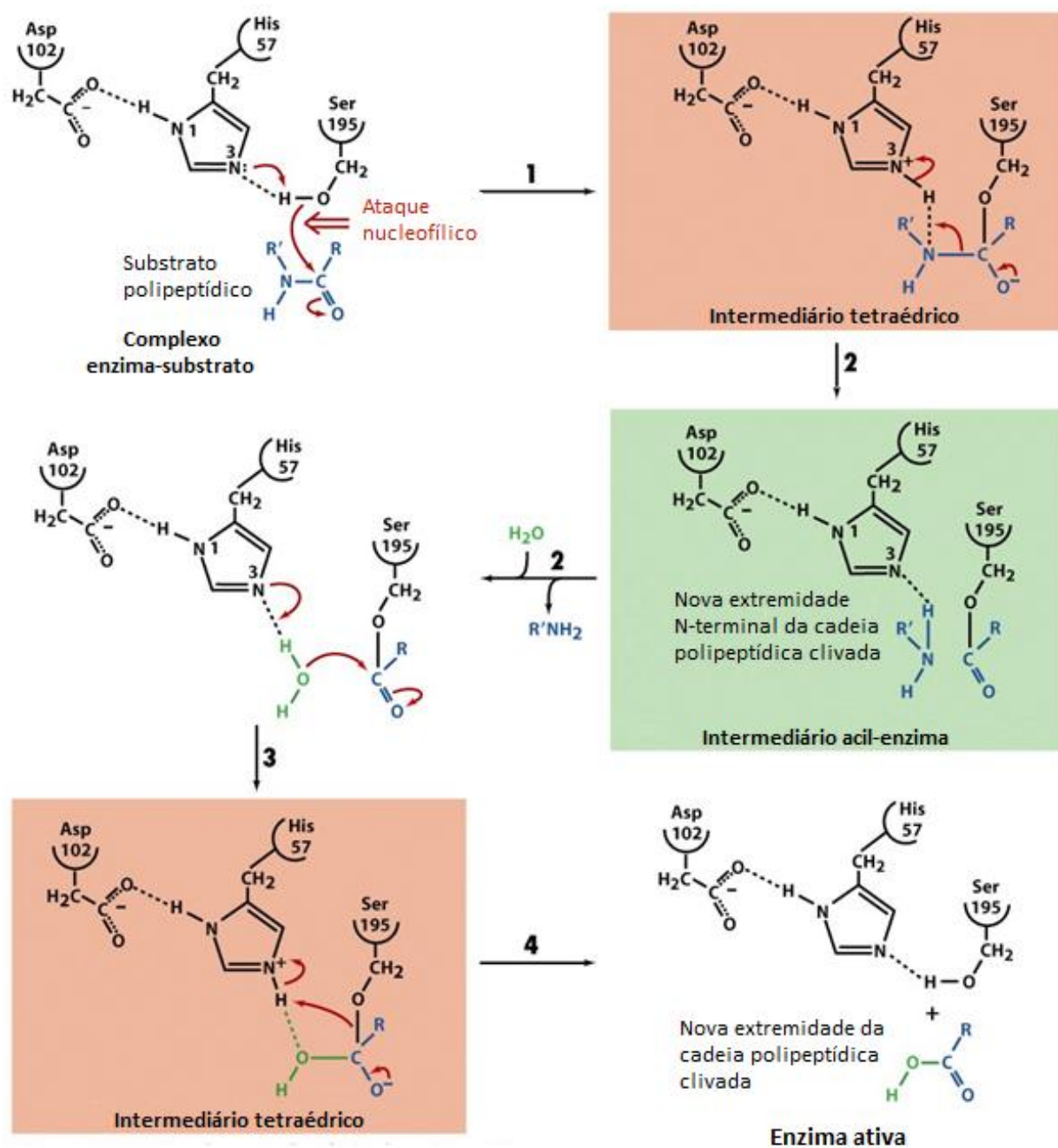


Figura 2: Mecanismo catalítico das serino proteases (VOET; VOET, 2013).

Especificamente, a tripsina, que é uma serino protease, é um modelo interessante para estudos termodinâmicos porque as propriedades básicas de algumas isoformas como estrutura tridimensional, atividade enzimática e alguns dados sobre estabilidade térmica já são conhecidas.

1.3.3 Ativação do tripsinogênio e formação das isoformas de tripsina.

A tripsina bovina é uma enzima proteolítica produzida nas células acinares do tecido pancreático na forma de seu zimogênio (tripsinogênio) que tem atividade proteolítica restrita. Seguindo sua secreção no intestino, o tripsinogênio é convertido para a forma ativa da tripsina (β -tripsina), reação esta catalisada pela enteroquinase, uma serino-protease que possui um único seguimento transmembrana localizado na mucosa do duodeno, e pela própria β -tripsina recém formada (auto-ativação) (BODE; FEHLHAMMER; HUBER, 1976; BODE; SCHWAGER; HUBER, 1978) (Figura 3).

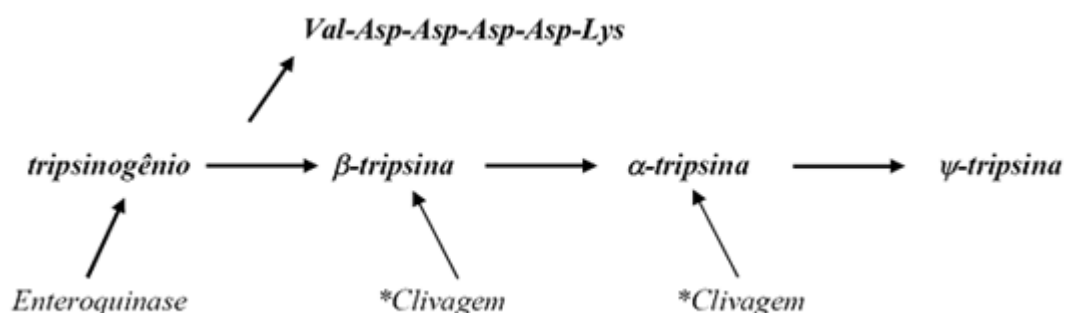


Figura 3: Conversão de tripsinogênio nas isoformas de tripsina. *A beta-tripsina recém-formada também atua na ativação junto à enteroquinase e nas clivagens adicionais

A conversão do tripsinogênio na isoforma β -tripsina consiste na clivagem da ligação peptídica feita pela enteroquinase entre os resíduos de aminoácidos Lys (6) e Ile (7) (nomenclatura baseada na sequência do tripsinogênio) no lado carboxílico o que promove a saída do hexapeptídeo N-terminal (Figura 3) Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (DAVIE; NEURATH, 1955).

O recém-formado grupo α -amino da Ile (7) forma uma ponte salina com o resíduo Asp (194) (PERKINS; WUTHRICH, 1980) introduzindo, assim, significativas modificações estruturais na nova molécula formada (β -tripsina).

No tripsinogênio, o sítio de especificidade e o espaço oxianiónico estão imprópriamente formados, mas mesmo assim, ele apresenta uma atividade residual de aproximadamente 0,5% da atividade da β -tripsina. Essa nova conformação assumida pela β -tripsina faz com que ela se torne 200 vezes mais ativa (ROBINSON; NEURATH; WALSHY, 1973) que o tripsinogênio.

Seguindo-se o processo de autólise, após a formação da β -tripsina, a sequência peptídica desta isoforma sofre uma clivagem adicional entre os resíduos Lys (131) e Ser (132) (Figura 4), originando uma segunda forma ativa da tripsina, conhecida como α -tripsina (SCHROEDER; SHAW, 1968). A α -tripsina formada possui basicamente a mesma estrutura secundária da isoforma β -tripsina, sendo a diferença baseada na menor porcentagem de estruturas em folha beta (FOUCAULT et al., 1974). Contudo, a α -tripsina apresenta-se 40% menos ativa que a β -tripsina frente ao substrato amidásico N- α -Benzoil-DL-arginina-4-nitroanilina (BAPNA) e nenhuma diferença significativa frente a substratos ésteres como acetato de p-nitrofenila, em pH ótimo (FOUCAULT; SEYDOUX; YON, 1974).

Uma terceira isoforma de tripsina é gerada quando ocorre uma nova clivagem entre os resíduos Lys (176) e Asp (177) (Figura 4) resultando na ψ -tripsina, que possui três cadeias polipeptídicas interligadas por pontes dissulfeto (Smith & Shaw, 1969). Essa nova isoforma é menos específica que as demais e possui uma insignificante atividade amidásica frente a substratos sintéticos (FOUCAULT; SEYDOUX; YON, 1974; FOUCAULT et al., 1974).

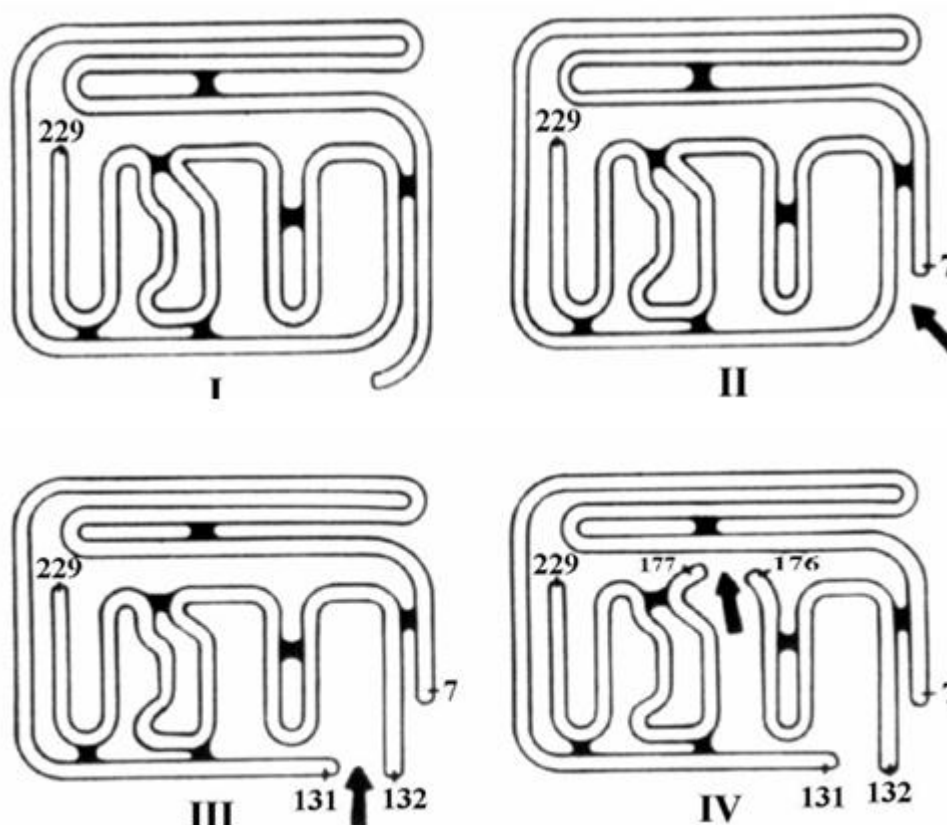


Figura 4: Pontos de clivagem na conversão de tripsinogênio para as isoformas ativas de tripsina bovina. As setas indicam onde ocorreu uma clivagem proteolítica. I- tripsinogênio, II- β -tripsina, III α -tripsina, IV ψ -tripsina. (KEIL, 1971).

Outras isoformas de tripsina formam-se ainda durante o processo de ativação, porém algumas delas possuem atividades proteolíticas muito baixas ou nenhuma atividade amidásica ou esterásica e algumas ainda não foram caracterizadas (MAROUX; ROVERY; DESNUELLE, 1966, 1967). A formação destes produtos inativos é fortemente inibida por cátions divalentes tais como cálcio. Na ausência destes íons a quantidade de proteínas sem atividade enzimática pode resultar até em 50% do zimogênio que foi ativado. Em concentrações de 10 a 20 mmol.L⁻¹ de íons cálcio, estes aceleram a quebra seletiva da ligação entre Lys (6) e Ile (7), deste modo promovendo a formação de β -tripsina, evitando-se assim clivagens não específicas (MCDONALD; KUNITZ, 1941).

1.3.4 Estruturas secundária e terciária

No que se refere à estrutura tridimensional pôde-se observar, por métodos cristalográficos (BODE; FEHLHAMMER; HUBER, 1976; BODE; SCHWAGER; HUBER, 1978; BODE; SCHWAGER, 1975), que a molécula de β -tripsina apresenta um arranjo tridimensional globular com dois domínios de estruturas similares (Figura 5). O primeiro domínio compreende do 1º resíduo de aminoácido ao 105º e o segundo do 106º ao 223º, estes domínios estão unidos assimetricamente e entre eles está localizado o sítio catalítico (Figura 5).

O tripsinogênio e as isoformas de tripsina (β , α e ψ) são constituídos, respectivamente, por uma, duas e três cadeias polipeptídicas sendo essas cadeias interligadas por seis pontes dissulfeto (Figura 5) localizadas nos resíduos Cys (13)-Cys (143), Cys (31)-Cys (47), Cys (115)-Cys (216), Cys (122)-Cys (189), Cys (154)-Cys (168) e Cys (179)-Cys (203) (MIKES et al., 1966; WALSH; NEURATH, 1964). A ponte dissulfeto (13-143) interliga os dois domínios, enquanto que as pontes dissulfeto restantes são intradomínios. O primeiro domínio possui uma ponte dissulfeto (Cys (31)-Cys (47)) e as outras quatro pontes estão no segundo domínio.

A estrutura tridimensional da isoforma β -tripsina apresenta 85% de identidade com o tripsinogênio e é principalmente caracterizada por apresentar estruturas do tipo folhas beta-antiparalelas que juntas se organizam formando dois betas barris unidos assimetricamente contendo pequenos segmentos de alfa-hélice (Figura 5).

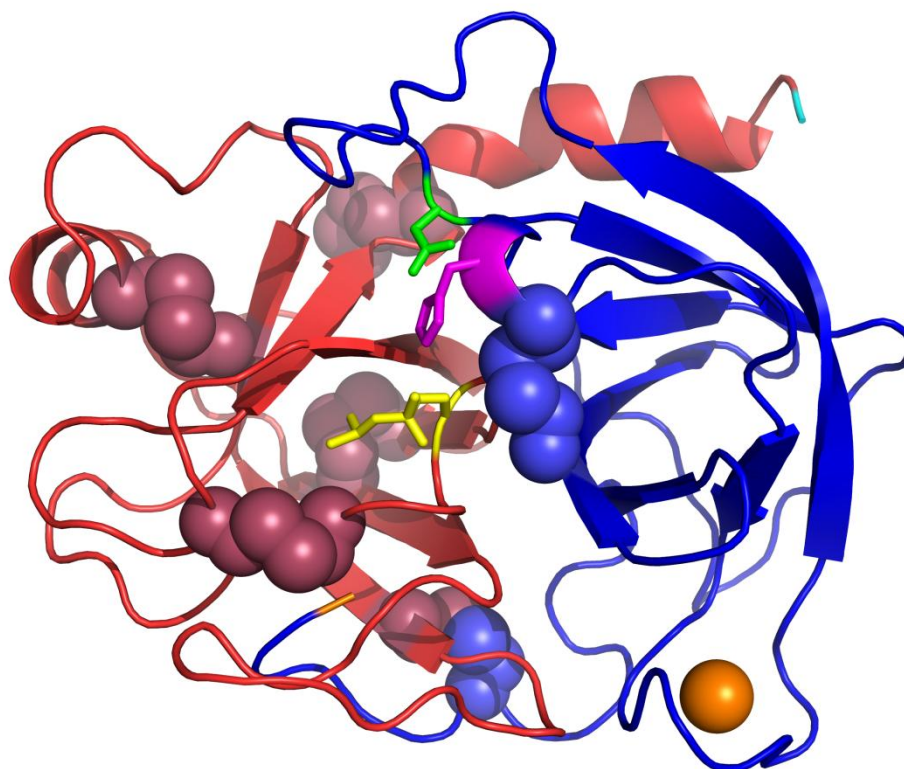


Figura 5: Estrutura tridimensional de β -tripsina bovina. O primeiro domínio está realçado em cor azul (1-105) e o segundo domínio realçado em cor vermelha (106-223). O resíduo de aminoácido N-terminal está representado em cor laranja e o C-terminal em cor ciano. Os resíduos de aminoácidos que compõe a tríade catalítica estão representados em modo de bastão Ser¹⁹⁵ (amarelo), His⁵⁷ (lilás) e Asp¹⁰² (verde). As pontes dissulfeto estão representadas pelas esferas azuis no primeiro domínio, vermelhas no segundo domínio e azul-vermelha no interdomínio (ligação entre os dois domínios). O íon metálico Ca²⁺ que está em seu sítio de ligação é representado por uma esfera de cor laranja acondicionada em uma alça da molécula de proteína (5ptp.pdB).

1.4 Fatores que influenciam a atividade enzimática

Vários fatores podem influenciar na atividade enzimática *in vitro* ou *in vivo*, incluindo temperatura, pH e agentes desnaturantes como ureia e cloridrato de guanidina que levam à desnaturação da proteína e consequentemente à perda de atividade (KUMAR; VENKATESU, 2012).

A temperatura atua fisicamente nos sistema proteína/água de modo que um aumento na temperatura do sistema desencadeia um aumento na energia cinética média das moléculas de água e dos aminoácidos da proteína. Este aumento de energia cinética faz com que a vibração tanto da água como dos aminoácidos aumente e assim as interações fracas (dependentes de distância) tendem a se desfazer. A perda dessas interações fracas que mantêm a proteína no estado nativo consequentemente desnatura a proteína (PARTRIDGE; MOORE; HALLING, 1999).

Outro fator físico que pode desnaturar proteínas é a mudança de pH já que o seu aumento ou a diminuição altera a rede eletrostática na superfície de uma proteína. Por exemplo, a diminuição do pH faz com que os aminoácidos carregados na superfície de uma proteína fiquem carregados positivamente e o excesso de cargas positivas leva à repulsão eletrostática entre os aminoácidos carregados aumentando a distância entre eles e enfraquecendo interações fracas do tipo eletrostática, levando à desnaturação da proteína (GRIMSLEY; SCHOLTZ; PACE, 2009; HARRIS et al., 2002).

Já a ureia e a guanidina atuam como desnaturantes químicos. Como elas possuem dois grupamentos NH_2 , são capazes de interagir e competir por ligações de hidrogênio desfazendo a rede de interações que mantêm a estrutura tridimensional da molécula. Além disso, possuem uma característica intrínseca de interagir fortemente com aminoácidos hidrofóbicos fazendo assim com que interações hidrofóbicas no interior da proteína se enfraqueçam (KUMAR; VENKATESU, 2012).

1.5 Termodinâmica e estabilidade de proteínas

O estudo da termodinâmica de proteínas tem atraído a atenção de várias linhas de pesquisa devido, por exemplo, ao fato de que uma molécula de proteína consiste de muitos milhares de átomos em movimento (translacional, rotacional e vibracional) dependente de variação de temperatura e este conjunto de átomos é um sistema “macroscópico”. Outro aspecto interessante é que a termodinâmica de uma proteína é esperada ser muito incomum, devido à organização espacial deste sistema “macromolecular” ser especialmente bem ordenado (PRIVALOV, 1989).

Cada átomo na proteína nativa ocupa uma posição definida (sujeita a oscilações) como em um cristal, mas ao contrário de um cristal, a proteína não possui simetria e nem periodicidade na disposição de seus átomos. Tal sistema macroscópico ordenado e aperiódico nunca tinha sido tratado anteriormente do ponto de vista físico. Logo, não se podem prever propriedades termodinâmicas de uma dada proteína e correspondentemente, não se pode engenheirar uma nova molécula (PRIVALOV, 1989).

Sem o conhecimento da termodinâmica, todas as discussões sobre os princípios da organização de uma proteína, mecanismos de enovelamento e estabilização de estruturas tridimensionais são meras especulações. Isso se tornou óbvio apenas depois de muitos anos de tentativas, sem sucesso, de resolver esses problemas apenas analisando a informação estrutural das proteínas (PRIVALOV, 1989).

A estabilidade termodinâmica de uma proteína é a medida de quanto mais estável é sua conformação globular ou nativa em comparação ao seu estado desnaturado (AHMAD; YADAV; TANEJA, 1992; PACE; BREAT A.; JAMES A., 1990). A forma nativa da proteína, ou seja, sua estrutura terciária ou quaternária está em um mínimo de energia e demonstra vários graus de flexibilidade, principalmente na superfície e nas extremidades amino e carboxi-terminal, onde as cadeias laterais e as alças possuem conformações alternativas. Para que ocorra um processo no qual a proteína passe de um estado nativo para o desnaturado é necessário um aumento significativo da energia livre (PACE; BREAT A.; JAMES A., 1990) à temperatura ambiente e sem a ajuda de desestabilizantes.

Em contrapartida, sabendo-se que a conformação nativa das proteínas pode ser facilmente desfeita e que a cadeia polipeptídica pode desenovelar-se por meio de processos físicos (temperatura e pressão) ou químicos (variação do pH e adição de substâncias desnaturantes) (PRIVALOV, 1989), torna-se importante entender os mecanismos relacionados à estabilidade das proteínas.

A estabilidade é importante para manter a estrutura nativa da proteína, evitando-se que ela adquira outras conformações que sejam diferentes da nativa, sem, no entanto, ser tão rígida a ponto de impedir mudanças conformacionais ou ajustes necessários à função (BECKTEL; SCHELLMAN, 1987; DILL et al., 2008).

O processo reversível de enovelamento e desenovelamento das proteínas pode ser estudado por vários métodos sensíveis capazes de detectar mudanças na estrutura das moléculas, como espectroscopia UV, dicroísmo circular (CD) (MARTINS; SANTORO, 1999; MARTINS, 1998; MARTINS et al., 2003; NASSER BRUMANO, 2000), ressonância magnética nuclear (RMN) (TAMURA; PRIVALOV, 1997), espectroscopia de fluorescência (HILSER, 2001), cromatografia de exclusão molecular (LIGHT; HIGAKI, 1987), dentre outros.

Os métodos espectroscópicos são extremamente sensíveis e capazes de fornecer informação estrutural de alta resolução e parâmetros termodinâmicos. Eles fornecem informações termodinâmicas indiretas, ou seja, uma determinação de parâmetros termodinâmicos usando sondas. O comportamento destas sondas revela, onde os principais parâmetros termodinâmicos (T_m e ΔH) são determinados através de ajustes matemáticos destas medidas.

Para que se conheça a descrição termodinâmica do sistema, torna-se necessário obter dados sobre as variações de *entalpia* (H) e *entropia* (S) dos processos relacionados ao enovelamento e desenovelamento das proteínas, a variação da *capacidade calorífica* (ΔC_p) desses estados e a sua dependência de diferentes condições de solventes, temperatura e pH, e, finalmente, a determinação da variação da *energia livre de Gibbs* (ΔG) (HAYNIE, 2001).

Assim, os estudos termodinâmicos dos estados enovelado e desenovelado de proteínas na presença de agentes desnaturantes podem fornecer informações quantitativas e qualitativas importantes sobre a estabilidade das moléculas.

2 JUSTIFICATIVA

A escolha de se estudar a isoforma α -tripsina dentre as quatro já descritas se deve a razão da enzima apresentar a característica de possuir atividade enzimática amidásica e esterásica quase 50% de cada. Esta é uma vantagem já que a isoforma β -tripsina apesar de ser a isoforma em maior quantidade, possui preponderantemente a atividade amidásica assim como a isoforma ψ -tripsina apresenta atividade preponderante esterásica. O emprego de enzimas em meio aquoso é intensivamente usado em processos catalíticos, tanto na área tecnológica como científica, há várias décadas. Porém, seu uso tornou-se limitado pelo fato de muitos substratos serem pouco solúveis em água. O uso de solventes orgânicos ou a mistura aquo-orgânico é uma forma direta de aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos e de tornar a reação possível. Dentre as numerosas aplicações de reações enzimáticas em meio orgânico, destacam-se a síntese de produtos de interesse nas áreas: clínica, nutricional, ambiental, industrial e biotecnológica e outras. Entretanto, os solventes orgânicos afetam a atividade catalítica de enzimas. Desta forma, o estudo dos parâmetros cinéticos, estruturais e termodinâmicos de enzima em sistemas aquo-orgânicos pode fornecer parâmetros importantes para o entendimento da atividade da enzima em meio aquo-orgânico e possibilitar possíveis aplicações em reações de biocatálise.

3 HIPÓTESE

Se a enzima α -tripsina em meio aquoso tem atividade e estabilidade ótimas, então em solvente orgânico sua atividade diminui devido a fatores como inibição e ou fatores irreversíveis na estrutura molecular. Sendo que:

- a. Os solventes orgânicos alteram as propriedades gerais do meio como a constante dielétrica (ϵ), momento dipolo (μ) e Log P que são indicadores de hidrofobicidade.
- b. Os solventes orgânicos mudam a estabilidade conformacional e termodinâmica das proteínas.
- c. Os solventes orgânicos atuam como inibidores.

3.1 Objetivo geral

Purificar, isolar e caracterizar as propriedades físico-químicas da isoforma α -tripsina bovina em meio aquo-orgânico.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar a atividade enzimática da α -tripsina bovina frente ao substrato amidásico (BAPNA) em função da variação da concentração dos solventes orgânicos: metanol, etanol, n-propanol e DMSO nas concentrações de 10 a 95% (v/v) em tampão tris-HCl, pH 8,0.
- Obter os parâmetros termodinâmicos C_m , T_m , ΔH_m , CI e PTS da isoforma α -tripsina bovina em diferentes meios aquo-orgânicos.
- Obter os parâmetros cinéticos da α -tripsina bovina em solvente aquo-orgânico como K_m , K_{cat} , V_{max} , K_{cat}/K_m .

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

A tripsina bovina comercial (EC 3.4.21.4) tipo I (lote 8003), tris (hidroximetil aminometano) e N- α -Benzoil-DL-arginina-4-nitroanilina (BAPNA), foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). O cloreto de cálcio, ácido acético, ácido clorídrico, metanol, etanol, n-propanol, dimetilsulfóxido (DMSO), fosfato de sódio e glicina foram adquiridos da Synth (Diadema, SP, Brasil). Todos os experimentos foram realizados com água reagente tipo I obtida através do sistema de ultrapurificação de água EASYpure II® Thermo Scientific.

4.2 Purificação das isoformas de tripsina

A isoforma α -tripsina bovina foi obtida a partir da purificação da tripsina comercial bovina. As isoformas foram isoladas por cromatografia de troca iônica catiônica de bancada utilizando a metodologia de (SANTOS et al., 2008b; TEIXEIRA, 1977). Esta etapa foi realizada em colaboração no Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas na UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais).

4.2.1 Determinação da massa molecular das isoformas de tripsina e pureza da α -tripsina por espectrometria de massa

A massa molecular e a pureza das isoformas de tripsina foram determinadas por espectrometria de massa usando a técnica de dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF-“*Matrix assisted Laser Desorption /Ionisation-Time of Flight*”).

As amostras de α -tripsina (0,05 mg.mL⁻¹) foram dissolvidas em uma solução saturada de ácido sinapínico (5,0 mg solução aquosa de TFA 3%: acetonitrila: água 1:4:5, v/v) na proporção de 1:3 (v/v) amostra:matriz, e, em seguida, aplicadas em triplicata (0,5 μ L/poço) sobre uma placa de aquisição de dados do MALDI (MTP Anchorchip_ 384x600) e deixada secar à temperatura ambiente.

A massa molecular foi obtida usando um AUTOFLEX_III MALDI-ToF/ToF (BrukerTM) operando no modo linear positivo. Foi realizada uma calibração linear usando o Kit de calibração da Bruker (Protein Calibration Standard II):

- Tripsinogênio $[M+ H]^+ = 23.982$
- Proteína A $[M+ H]^+ = 44.613$
- Albumina-Bovina $[M+ H]^+ = 66.431$
- Proteína A $[M+ 2H]^{2+} = 22.306$
- Albumina-Bovina $[M+ 2H]^{2+} = 33.216$

Para análise dos dados foi utilizado o programa Flex Analysis® (Bruker Daltonics), onde o dado bruto teve subtraída a linha de base seguida de um tratamento de suavização das curvas e então a proteína teve sua massa molecular determinada.

Este experimento foi realizado em colaboração na Embrapa Cenargen em colaboração com professor Marcelo Porto Bemquerer.

4.3 Efeito da concentração de solvente orgânico na atividade enzimática da α -tripsina

A atividade amidásica da α -tripsina foi determinada utilizando a metodologia descrita por (ASCENZI et al., 1981; ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961) usando o substrato sintético cromogênico N- α -Benzoil-DL-arginina-4-nitroanilina (BApNA) armazenado em solução estoque de 90 mmol.L⁻¹ em DMSO. O produto cromogênico (4-nitroanilina) formado foi detectado por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm.

Para cada ensaio, 2,0 μ L da solução de α -tripsina (solução estoque de $1,07 \times 10^{-1}$ mmol.L⁻¹ em pH 3.0) foi adicionada a 97,0 μ L de uma mistura de solvente orgânico (metanol, etanol ou DMSO de 10-95% v/v) com solução tampão tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ contendo 20 mmol.L⁻¹ de cloreto de cálcio. Esse sistema foi incubado a 37 °C durante 10 minutos e então, foi adicionado 1,0 μ L da solução estoque de BApNA (90 mmol.L⁻¹ em DMSO), levando a concentração final da enzima a $2,14 \times 10^{-3}$ mmol.L⁻¹. Após 15 minutos de reação, 25,0 μ L de solução aquosa de ácido

acético 60% v/v foi adicionada a fim de paralisar a reação. Então absorbância do produto foi medida no espectrofotômetro NanoDrop® 2000 Thermo e os dados foram expressos como média ($n=3$) \pm desvio padrão. Todas as determinações de concentração de proteína usada neste trabalho foram feitas por espectrofotometria utilizando o coeficiente de extinção molar da α -tripsina que é de $40,000 \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (WALSH; WILCOX, 1971).

Os dados brutos da absorbância foram submetidos a uma regressão não-linear do tipo Boltzmann, equação 1, no OringPro® 8.0.

$$y = \left(\frac{y_f - y_u}{1 + e^{\frac{x-x_0}{dx}}} \right) + y_u \quad (1)$$

Onde: y é o valor da absorbância ajustada, y_f e, y_u são os valores de absorbância no estado nativo e desnaturado respectivamente, x é a concentração percentual v/v de solvente orgânico, x_0 é o C_m , dx é um parâmetro gerado pela inclinação da reta no dx . Os parâmetros: C_m (concentração percentual v/v de solvente orgânico na qual a proteína apresenta 50% da sua atividade), PTS (concentração percentual de solvente orgânico na curva de desnaturação onde se inicia a transição) e CI (índice de cooperatividade, que é o inverso da variação da concentração de solvente na região de transição, $1/\Delta C$), todos estes parâmetros foram derivados do ajuste descrito acima.

4.4 Efeito da concentração de solvente orgânico na estabilidade conformacional da α -tripsina medido por espectroscopia de varredura UV-VIS.

A fim de investigar a estabilidade conformacional da α -tripsina em sistemas aquo-orgânicos, utilizou-se o método de variação da absorção (NASSER BRUMANO, 2000), avaliação da segunda (RAGONE et al., 1984) e quarta derivada (PATROS et al., 1982) nos comprimentos de onda específicos para os resíduos de aminoácidos Phe (260 nm), Tyr (275, 279 e 285 nm) e Trp (294 nm). Este método avalia indiretamente a exposição dos resíduos aromáticos na superfície da proteína relacionando esta informação com a desnaturação protéica. Assim, quando uma proteína sofre desnaturação, espera-se que exista um deslocamento do

comprimento de onda máximo de absorção para comprimentos de ondas maiores ("red shift") além de uma redução na absorção para este comprimento de onda. Para obtenção dos dados o solvente orgânico etanol foi adicionado ao sistema tampão composto por 100 mmol.L⁻¹ de glicina pH 3,0 contendo 20 mmol.L⁻¹ de cloreto de cálcio nas proporções de 10-80% v/v. A concentração final de proteína foi de $1,7 \times 10^{-2}$ mmol.L⁻¹.

As leituras espectroscópicas foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C) no espectrofotômetro Thermo Scientific™ Evolution™ 300, localizado no Laboratório Multiusuário de Análise Biomolecular (LABIOM/UFES) e os dados expressos como média (n=3) ± desvio padrão. Para cada sistema aquo-orgânico foram realizadas varreduras com os seguintes parâmetros.

- ✓ Varredura de 260 a 310 nm.
- ✓ Resolução 1 nm.
- ✓ Passo 1 nm.
- ✓ Velocidade de varredura 600 nm/min.
- ✓ 10 ciclos por amostra.

A média das leituras espectroscópicas dessas amostras gerou um gráfico absorbância *versus* concentração de solvente orgânico para os comprimentos de onda relacionados aos resíduos de aminoácidos Phe, Try, Trp.

4.5 Efeito da concentração de CaCl₂ na atividade enzimática da α-tripsina em sistema aquo-orgânico.

O ensaio para avaliar o efeito da concentração de cloreto de cálcio na atividade amidásica da α-tripsina foi realizado a 37 °C. O meio aquoso foi composto por solução tampão tris-HCl pH 8,0 100 mmol.L⁻¹ e o meio aquo-orgânico por etanol-tampão 60% v/v. As concentrações finais de cloreto de cálcio utilizadas foram 0, 2, 20, 50, 100, 200, 300 e 400 mmol.L⁻¹ e a concentração final de proteína foi de $2,14 \times 10^{-3}$ mmol.L⁻¹. A solução de α-tripsina foi previamente dialisada pelo fator de 10⁶ vezes em solução aquosa HCl pH 3,0 a 4 °C por 24 horas a fim de retirar o cálcio residual durante o processo de purificação. Após a diálise, o teste de atividade foi

realizado conforme o item 4.2. A equação 2 foi utilizada para cálculo da atividade específica.

$$\text{Atividade específica } \left(\frac{U}{mg}\right) = \frac{A \cdot V_r \cdot 10^6}{t \cdot \varepsilon \cdot l \cdot x} \quad (2)$$

Onde A é a absorbância do produto (4-nitroanilina) formado; V_r é o volume reacional (L); t é o tempo (minutos); os coeficientes de extinção molar (ε) para 4-nitroanilina em tampão e etanol-tampão 60% v/v foram calculados experimentalmente (ver item 4.4.1); l é o caminho óptico (cm); x é a massa em mg de proteína.

Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1 μmol do produto por minuto. Os valores foram expressos como média ($n=3$) \pm desvio padrão.

4.5.1 Cálculo do coeficiente de extinção molar (ε) para 4-nitroanilina.

Com a finalidade de calcular a atividade específica e parâmetros cinéticos da α -tripsina em tampão e etanol-tampão 60% v/v, o coeficiente de extinção molar (ε) do cromóforo (4-nitroanilina) foi calculado através da inclinação da reta do gráfico absorbância *versus* concentração de 4-nitroanilina. Desta forma, uma solução estoque de 4-nitroanilina a 90 mmol.L^{-1} em DMSO foi preparada e alíquotas desta solução foram retiradas e adicionadas ao sistema tampão, composto por tris-HCl 100 mmol.L^{-1} pH 8,0 com 20 mmol.L^{-1} de cloreto de cálcio e ao sistema etanol-tampão 60% v/v (C_m) de modo a obter soluções com concentrações variando de $1,1 \times 10^{-5}$ a $9,0 \times 10^{-5}$ mmol.L^{-1} de 4-nitroanilina. As leituras de absorbância a 410 nm (ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961) foram realizadas à temperatura ambiente (25°C) no espectrofotômetro Thermo Scientific™ Evolution™ 300. Os dados foram expressos como média ($n=3$) \pm desvio padrão.

4.6 Ensaio da estabilidade térmica da α -tripsina em função do tempo e temperatura em sistema aquo-orgânico.

Com a finalidade de investigar a estabilidade térmica da α -tripsina em sistema tampão e sistema etanol-tampão 60% v/v no seu C_m , pois nesta concentração a atividade enzimática foi de 50%, foram realizados ensaios conforme o item 4.3, mas com mudanças nas temperaturas, que variavam de 298,15 K a 348,15 K e do tempo reacional que variou de 10 a 70 minutos.

Para realização deste ensaio, a cada 10 minutos foram coletados 4,0 μ L da solução reacional em tubos contendo 1,0 μ L de solução de ácido acético a 60% v/v. A leitura de absorbância a 410 nm foi feita no NanoDrop® 2000 Thermo e a quantidade de produto formado (4-nitroanilina) foi calculada conforme equação 2. Especialmente neste ensaio, para que o pH da solução fosse mantido em 8,0 nas temperaturas testadas, foram feitas correções no pH da solução a temperatura ambiente levando em conta o dpK_a/dT do tris-HCl (-0,028/°C) (SANTOS et al., 2008b).

4.7 Estudo de desnaturação térmica da α -tripsina em sistema aquo-orgânico.

A fim de monitorar a desnaturação térmica da α -tripsina em sistema aquo-orgânico, utilizou-se o método de variação da absorção entre os estados nativo e denaturado (NASSER BRUMANO, 2000) nos comprimentos de onda específicos para os resíduos de aminoácidos Phe (260 nm), Tyr (275, 279 e 285 nm) e Trp (294 nm). Este método avalia indiretamente a exposição dos resíduos aromáticos na superfície da proteína relacionando esta informação com a desnaturação proteica.

Para obtenção desses dados, solventes orgânicos foram adicionados ao sistema tampão composto por 100 mmol.L⁻¹ de glicina pH 3,0 contendo 20 mmol.L⁻¹ de CaCl₂. Assim, foram obtidos os seguintes sistemas solventes: tampão, metanol-tampão 50% v/v, etanol-tampão 60% v/v e propanol-tampão 49% v/v, sendo que, a concentração final de proteína foi de $1,7 \times 10^{-2}$ mmol.L⁻¹.

Para realizar a termoestabilização, as cubetas contendo amostra e referência, foram submetidas a um banho externo (banho ultratermostático, Quimis) nas

temperaturas de 292,15 a 352,15 K, variando 2K. Após atingir a temperatura desejada a amostra e referência permaneceram no banho por dez minutos. Em seguida ambas foram retiradas do banho e realizadas varreduras espectroscópicas a 25 °C no espectrofotômetro Thermo Scientific™ Evolution™ 300.

O espectrofotômetro foi ajustado com os seguintes parâmetros.

- ✓ Varredura de 260 a 310 nm.
- ✓ Resolução 1 nm.
- ✓ Passo 1 nm.
- ✓ Velocidade de varredura 600 nm/min.
- ✓ 5 ciclos por amostra.

A média das leituras espectroscópicas dessas amostras gerou um gráfico, absorvância *versus* concentração de solvente orgânico para os comprimentos de onda relacionados aos resíduos de aminoácidos Phe, Try, Trp.

4.7.1 Cálculos dos parâmetros termodinâmicos

Os dados obtidos (gráfico absorvância *versus* temperatura) das curvas de desnaturação térmica foram submetidos a uma regressão não-linear de Boltzmann (equação 1) utilizando o programa OriginPro® 8.0. A análise da curva fornecerá os seguintes parâmetros: A_1 igual y_f e A_2 igual a y_u , x é a temperatura experimental (K), x_0 é o T_m (K) na qual a proteína tem sua estrutura desnaturada em 50 % pelo efeito do calor e dx é um parâmetro gerado pela inclinação da reta no T_m . A partir dos dados ajustados será calculada a fração de proteína desnaturada fU , segundo a equação 3 (PACE; BREAT A.; JAMES A., 1990),

$$fU = \left(\frac{y_f - y}{y_f - y_u} \right) \quad (3)$$

Onde y_f e y_u representam os valores de y característico do estado nativo e desnaturado, respectivamente e y é o valor mensurado.

A partir da dos dados obtidos pela equação 3 foi calculada a constante de equilíbrio (K) e a variação de energia livre (ΔG), para cada temperatura

experimental, usando as equações 4 e 5 respectivamente (PACE; SHIRLEY; THOMSON, 1990).

$$K = \frac{fU}{1 - fU} \quad (4)$$

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (5)$$

Onde R é constante universal dos gases (1,987 caloria/K/mol) e T é a temperatura em Kelvin.

Ainda com os dados obtidos da desnaturação térmica foi possível obter mais informações como variação de entalpia (ΔH_m) e entropia (ΔS_m). Para o cálculo de ΔH foi utilizada a equação de van't Hoff (6) bem como as equações 8 (PACE; BREAT A.; JAMES A., 1990), 9 e 10 (MERGNY; LACROIX, 2003).

A primeira maneira de calcular o ΔH é usando a equação 6.

$$-\frac{\Delta H}{R} = \frac{d(\ln K)}{d\left(\frac{1}{T}\right)} \quad (6)$$

No gráfico $\ln K$ versus $1/T$, utilizando os dados da região de transição, a inclinação da reta é igual a $d(\ln k)/d(1/T)$.

A segunda maneira de calcular o ΔH usando as equações 7 e 8.

Uma vez que no T_m (temperatura onde 50% da proteína está desnaturada), ΔG é igual a zero, pois no T_m , $fU = 0,5$; então de acordo com a equação 5, $K = 1$ como $\ln(1) = 0$.

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (7)$$

$$\Delta H_m = T_m \times \Delta S_m \quad (8)$$

Substituindo $\Delta G = 0$ na equação 7 obtemos de forma simplificada a equação 8. Onde ΔH_m vai ser ΔH no T_m e ΔS_m é igual a inclinação na reta do gráfico ΔG versus temperatura, na região de transição.

A terceira maneira de calcular o ΔH é usando a equação 9.

$$\Delta H = 4RT_m^2 \times \frac{1}{\Delta T} \quad (9)$$

Onde ΔT é a variação de temperatura na região de transição e x_0 corresponde ao valor de T_m .

A quarta maneira de calcular o ΔH é usando a equação 10.

$$\Delta H = 4RT_m^2 \times \frac{df_U}{dT} \quad (10)$$

A inclinação da reta do gráfico f_U versus temperatura é igual a df_U/dT e x_0 (obtido da regressão não linear de Boltzmann) corresponde ao valor de T_m .

4.7.2 Índice de cooperatividade (CI)

A cooperatividade é uma medida da eficiência do quanto a informação calorimétrica é passada entre as unidades internas da biomolécula. Portanto, processos físico-químicos muito cooperativos completam-se em uma faixa estreita de temperatura. Esse valor é inversamente proporcional à faixa de temperatura contida na região de transição na curva de desnaturação proteica.

O CI foi calculado de acordo com a equação 12

$$CI = \frac{1}{\Delta T} \quad (12)$$

Onde ΔT é variação de temperatura na região de transição.

4.8 Determinação de parâmetros cinéticos da α -tripsina em pH 8,0.

Para determinação dos parâmetros cinéticos, a atividade amidásica da α -tripsina foi monitorada usando o substrato sintético BA_pNA (0,09-2,70 mmol.L⁻¹). As medidas foram determinadas monitorando a liberação de 4-nitroanilina a 410 nm no espectrofotômetro Thermo Scientific™ Evolution™ 300 localizado no Laboratório Multiusuário de Análise Biomolecular (LABIOM/UFES).

O meio aquoso consistia de tampão: tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 8,0 contendo CaCl₂ a 20 mmol.L⁻¹ e o meio aquo-orgânico consistia de etanol-tampão 60% v/v com 20 mmol L⁻¹ de CaCl₂. O experimento foi realizado utilizando cubeta de quartzo contendo o volume reacional total de 1 mL. A concentração de proteína utilizada foi de 5,36 × 10⁻¹ mmol.L⁻¹. Todos os ensaios foram realizados a 25 °C.

Com a finalidade de obter o parâmetro dA/dt , o espectrofotômetro foi ajustado para fazer cada leitura (410 nm) de 20 em 20 segundos em um tempo total de reação de 30 minutos. Assim, esse parâmetro foi gerado através dos quatro primeiros pontos da inclinação da reta do gráfico, absorbância *versus* tempo obtidos através do programa Thermo Scientific™ VISION pro™.

A atividade foi calculada utilizando a equação 13.

$$Atividade \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\frac{dA}{dt} \cdot V_r \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot V_{EZ} \cdot l} \quad (13)$$

Onde dA/dt é a taxa de absorção da 4-nitroanilina a 410 nm em função do tempo em minutos (min⁻¹), V_r é volume reacional em litros (L), ε é o coeficiente de extinção molar conforme item 4.5.1, V_{EZ} é o volume de enzima adicional (mL) e l é o caminho óptico (1 cm).

Uma unidade de atividade (U) foi definida a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol do produto por minuto. Os valores são expressos como média (n=3) ± desvio padrão. Os dados brutos foram ajustados seguindo o modelo de Michaelis-Menten utilizando o software GraphPad Prism 5.0. A constante de Michaelis-Menten K_m , em μmol.L⁻¹, é definida como a concentração de substrato necessária para alcançar metade da velocidade máxima, V_{max} . A velocidade máxima, em μmol.L⁻¹.min⁻¹, é aquela alcançada quando a enzima está saturada pelo substrato. Ambos os valores foram determinados utilizando o software GraphPad Prism 5.0. O número de renovação (k_{cat}) da enzima nestes sistemas foi calculado conforme equação 14.

$$V_{max} = k_{cat}[E]_t \quad (14)$$

Onde $[E]_t$ é a concentração total de enzima.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Purificação da isoforma α -tripsina

A fim de isolar a isoforma de interesse em grande quantidade, foi realizada uma cromatografia de troca iônica catiônica de bancada aumentando a escala, conforme (SANTOS et al., 2008b). O perfil cromatográfico obtido (Figura 6) foi comparado com perfis clássicos relatados na literatura (SANTOS et al., 2008b; SCHROEDER; SHAW, 1968) e este apresentou semelhança com as referências citadas, demonstrando assim que o processo cromatográfico foi satisfatório.

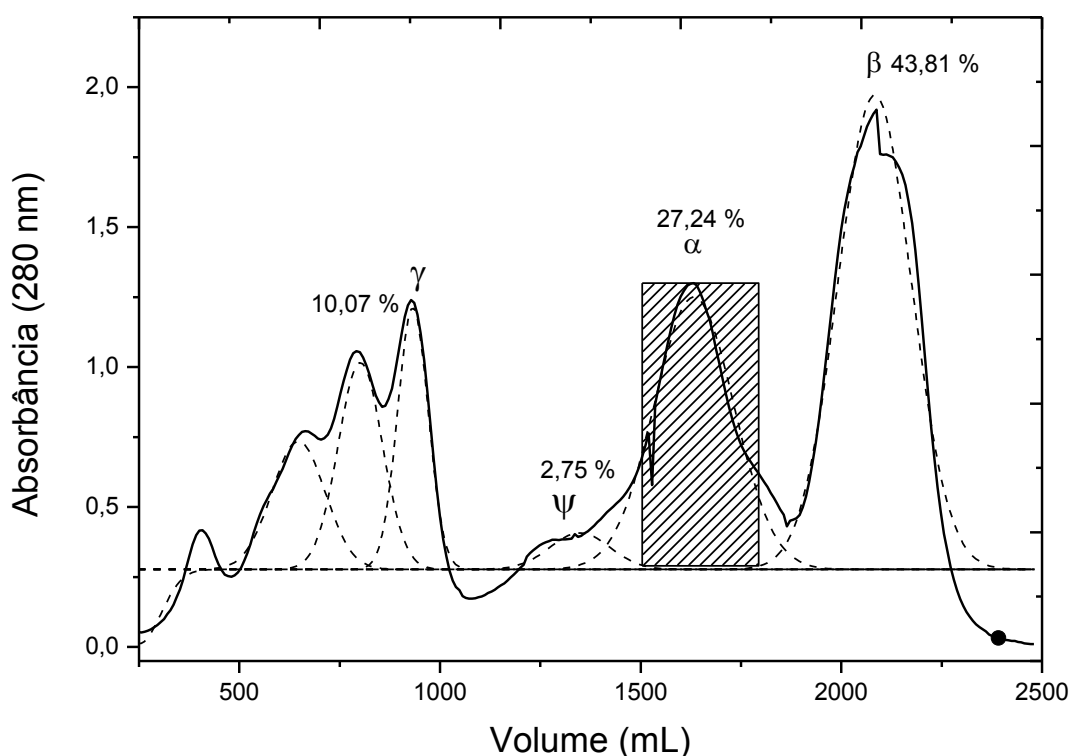


Figura 6: Cromatograma de troca catiônica de tripsina comercial bovino Sigma Tipo I lote 8003. Nas seguintes condições: Fluxo de 15 mL.h^{-1} sobre a fase estacionária SE-Sephadex C50, quantidade de partida de 1,0 g, usando uma fase móvel de 100 mmol.L^{-1} de Tris, pH 7,1 a 4°C , $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de CaCl_2 e $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de Benzamidina. Foram coletados 5,0 ml por tubo e os mesmos foram detectados a 280 nm. (—) detecção a 280 nm e (---) deconvolução matemática do perfil. De acordo com a área sob a curva correspondente a cada isoforma foi calculada sua porcentagem de composição da amostra total.

De acordo com a Figura 6, sete picos são observados, sendo que o pico de interesse neste estudo foi o sexto na ordem de eluição. Apesar, da resolução

cromatográfica ter sido baixa , ela foi considerada satisfatória, devido à facilidade de obtenção da isoforma (uma única etapa cromatográfica) e à quantidade obtida. Assim, essa condição padronizada permitiu obter quantidades suficientes da ordem de miligramas da isoforma α -tripsina para realizar sua caracterização. A fim de selecionar uma fração da isoforma α -tripsina pura a partir da análise do cromatograma (Figura 6) o perfil de eluição monitorado a 280 nm foi submetido a uma deconvolução matemática utilizando o software OriginPro 8[®] e os resultados podem ser observados na Figura 6 nas linhas tracejadas.

Através da análise do perfil deconvoluido (Figura 6) pode ser observado que a separação entre a isoforma α , β e ψ não é completa e ambas possuem uma área de mistura. Para que não fosse realizada uma segunda cromatografia, optou-se por utilizar os tubos contidos na área retangular hachurada (Figura 6) que continham apenas a isoforma α -tripsina, mesmo levando esta medida a um menor rendimento cromatográfico.

5.2 Determinação da pureza por espectrometria de massas

Além da caracterização cromatográfica, as isoformas de tripsina foram submetidas à espectrometria de massas MALDI-TOF-MS a fim de confirmar sua identidade em função da massa molecular. As massas moleculares obtidas para as frações referentes à β -, α - e ψ -tripsina (Figura 7) estão de acordo com trabalho prévio (SANTOS et al., 2008b), confirmando a identidade da isoforma.

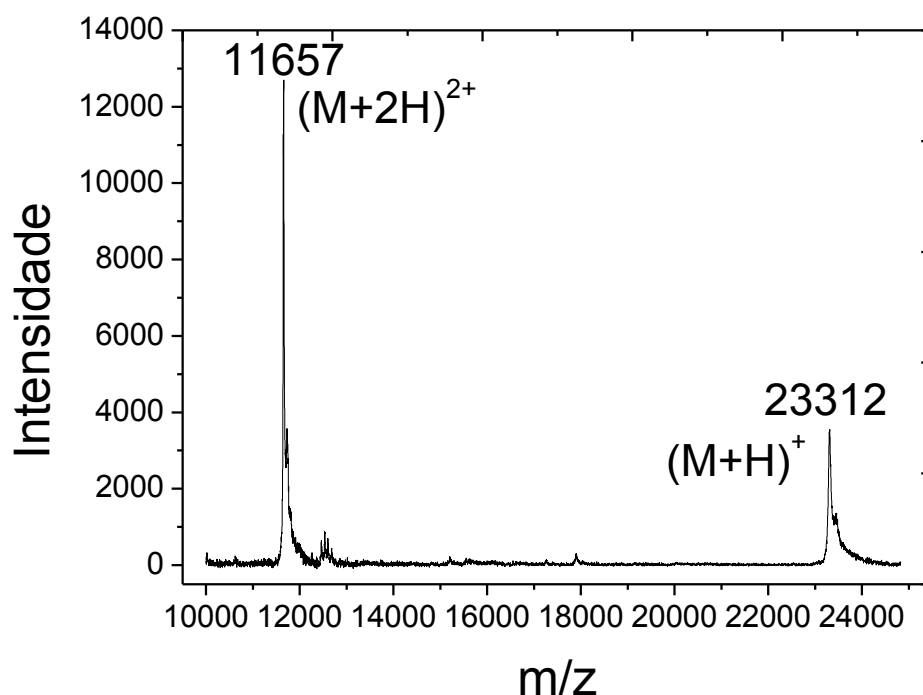


Figura 7: Espectrometria de massa da α -tripsina. Detecção realizada em MALDI-TOF-MS (Autoflex-Bruker) no modo linear positivo. $(M+H)^+$ é a molécula de α -tripsina carregada com um próton e $(M+2H)^{2+}$ carregada com dois prótons.

A pureza da fração de α -tripsina selecionada no retângulo hachurado (Figura 6) foi avaliada por espectrometria de massa e o resultado obtido a 40 ppm de exatidão com resolução de 1 Da (Figura 7) demonstra que existem apenas dois picos com alta intensidade: o pico dos íons $(M+H)^+$ com valor de 23.312 m/z e o $(M+2H)^{2+}$ com valor de 11.657 m/z. Como existe uma relação matemática entre os íons observados, ou seja, a relação m/z dos íons $(M+2H)^{2+}$ é metade dos $(M+H)^+$, então a massa da molécula contida no retângulo hachurado é de 23.312 Da. Este valor de massa molecular está dentro do esperado, pois a isoforma β -tripsina possui 23.294 Da (SANTOS et al., 2008b) e na formação da isoforma α -tripsina a partir da isoforma β - há quebra de uma ligação peptídica, então deve ser somado 18 Da nesse valor devido à inserção de um H e uma OH para estabilização das pontas formadas. A partir dos dados cromatográficos, ou seja, predição de ordem de eluição e massa molecular, pode se afirmar que a banda cromatográfica selecionada no retângulo hachurado é constituída da isoforma α -tripsina.

5.3 Efeito da concentração de solventes orgânicos na atividade amidásica da α -tripsina.

A fim de se conhecer melhor o efeito dos solventes orgânicos sobre atividade da α -tripsina, foram realizados testes de atividade em função das concentrações de solventes orgânicos. A Figura 8 mostra o efeito de diferentes concentrações de soluções aquosas de metanol, etanol, propanol e DMSO (10 a 95% v/v) sobre a atividade amidásica da α -tripsina, sendo que a solução aquosa foi composta por tampão tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 8,0 contendo 20 mmol.L⁻¹ CaCl₂.

Em geral, as curvas de atividade em função da concentração de solvente orgânico mostraram uma forma sigmoidal. Os dados brutos da Figura 8 foram ajustados no modelo de Boltzmann (linha tracejada ---) através do programa OriginPro® 8.0 utilizando a equação 1. Este procedimento foi importante para obter parâmetros como: *PTS* do inglês "*Pre-Transition-State*" que é o começo da pré-transição em porcentagem v/v de solvente orgânico, C_m que é a concentração percentual v/v de solvente orgânico na qual a proteína apresenta 50% da sua atividade, C_I que é o índice de cooperatividade que é inversamente proporcional à variação de concentração (ΔC) de solvente orgânico na região de transição $1/\Delta C$. Sendo que, ΔC foi calculado através do parâmetro dx e C_m gerados pelo ajuste não linear da equação 1, ou seja, $\Delta C = (C_m \pm 2dx)$.

As razões para alterações nas atividades de enzimas causadas pela adição de solventes orgânicos têm sido discutidas na literatura (BUTLER, 1979; KHMELNITSKY et al., 1988) e entre as mais importantes podemos citar: (a) Os solventes orgânicos alteram as propriedades gerais do meio como a constante dielétrica (ϵ), momento dipolo (μ) e Log P que são indicadores de hidrofobicidade (REICHARDT; WELTON, 2003); (b) Os solventes orgânicos mudam a estabilidade conformacional e termodinâmica das proteínas (SINGER, 1962; TIMASHEFF, 1968) e (c) Os solventes orgânicos atuam como inibidores (FRIDOVICH, 1966).

Sendo conhecido que solventes orgânicos podem perturbar a camada essencial de água em torno das enzimas causando alteração na atividade das mesmas (KHMELNITSKY et al., 1988; KLIBANOV, 1989; LAANE et al., 1987) e na tentativa de explicar o comportamento da enzima apresentado na Figura 8 e

Tabela 1, recorremos aos medidores de hidrofobicidade, que são parâmetros físico-químicos encontrados na literatura tais como constante dielétrica (ϵ), momento dipolar (μ), e log P para esses solventes (Tabela 2). Onde, Log P é definido como o logaritmo do coeficiente de partição em um sistema bifásico padrão octanol/água.

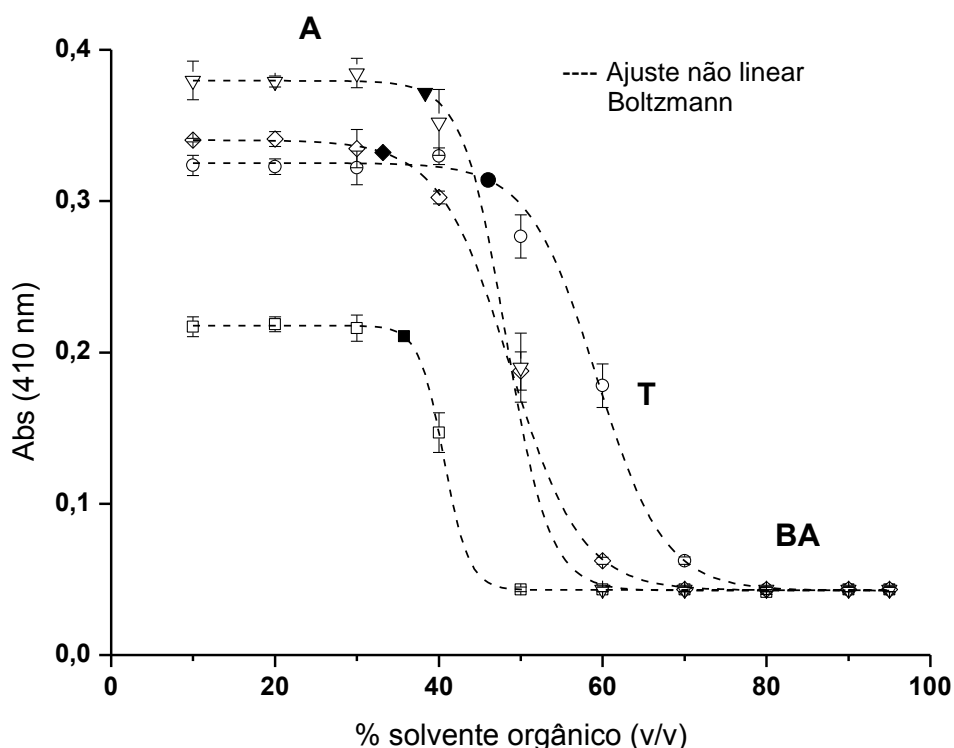


Figura 8: Atividade da isoforma α -tripsina em função da concentração de solvente orgânico (□ DMSO, ○ Etanol, ◇ Metanol, ▽ propanol, em porcentagem v/v). Temperatura de 37° C, tampão tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 8.0 com 20 mmol.L⁻¹ de CaCl₂ utilizando a isoforma α -tripsina e BApNA como substrato. A, T, BA e símbolos fechados representam: estado ativo, região de transição, estado de baixa atividade e início da pré-transição (PTS), respectivamente. Os valores são expressos como média (n=3) \pm desvio padrão.

Laane e col (1987) discutiram amplamente alguns parâmetros medidores de hidrofobicidade e concluírem que o Log P apresentava a melhor correlação com a atividade enzimática, esse fato não estava de acordo com nossos resultados, pois analisando os parâmetros constante dielétrica, momento dipolar e Log P, podemos concluir que todos eles seguem a mesma tendência. Logo, quaisquer destes

parâmetros podem ser usados nas discussões sem a necessidade de correlacioná-los.

Tabela 1: Parâmetros: C_m , PTS e CI obtidos da curva de desnaturação por indução química a 37 °C.

Sistema solvente	PTS (% v/v) ^a	C_m (% v/v) ^b	$CI(1/\Delta C)$ ^c
Metanol-tampão ^d	33,00 ± 1,00	48,68 ± 0,31	0,059
Etanol-tampão ^d	44,42 ± 1,00	59,23 ± 0,71	0,060
Propanol-tampão ^d	37,58 ± 1,00	48,18 ± 0,50	0,095
DMSO-tampão ^d	35,40 ± 1,00	40,58 ± 0,25	0,164

^aInício da pré-transição (PTS) é o começo da pré-transição em porcentagem v/v de solvente orgânico.

^bConcentração percentual v/v de solvente orgânico na qual a proteína apresenta 50% da sua atividade (C_m).

^cÍndice de cooperatividade (CI) é inversamente proporcional à variação da concentração de solvente orgânico na região de transição.

^dSistema solvente composto por tampão tris-HCl 100 mmol.L⁻¹, pH 8,0 com 20 mmol.L⁻¹ de CaCl₂ adicionado a solventes orgânicos (metanol, etanol, propanol e DMSO) separadamente nas proporções de 10 a 95% v/v.

Assim na Figura 8, o patamar superior, que é a região de pré-transição, mostra o valor de y para proteína 100% na forma ativa, correspondendo aproximadamente de 10 a 40% v/v de solvente orgânico. Nesta região, o PTS , que pode ser visualizado na Figura 8 através dos símbolos fechados na curva sigmoidal e numericamente dispostos na Tabela 1, é o parâmetro que indica o começo da perda de atividade a em função da concentração de solvente orgânico. Os resultados para o parâmetro PTS mostraram a seguinte sequência: metanol<DMSO<propanol<etanol. Portanto, o sistema onde a α -tripsina possui o menor PTS (metanol-tampão) é o sistema em que as moléculas proteicas começaram a perder atividade. Entretanto, este resultado está em desacordo em comparação com a constante dielétrica, visto que o DMSO possui maior constante dielétrica (Tabela 1), assim o sistema DMSO-tampão deveria ser o solvente mais perturbador da camada de hidratação, logo ele deveria ter o menor PTS causando maior perda na atividade da α -tripsina.

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos obtidos do Handbook

Solvente	Constante dielétrica ϵ	Momento dipolo $\mu(D)^a$	Log P^b
Metanol	33,0	$1,70 \pm 0,02$	-0,74
Etanol	25,3	$1,69 \pm 0,03$	-0,30
Propanol 1	20,8	$1,58 \pm 0,03$	0,25
DMSO	47,3	$3,96 \pm 0,04$	-1,35
H ₂ O	80,1	$1,82 \pm 0,00$	-

^aO momento de dipolo elétrico é dado em unidades de Debye (D). O fator de conversão de unidades do SI é uma $D = 30,3564 \times 10^{-30} \text{ C} \times \text{metros}$

^bLog P, definido como o logaritmo do coeficiente de partição em um sistema bifásico padrão octanol/água a 25 °C

Conforme os estudos de Gorman e Dordick (1992), os autores verificaram que o metanol, apesar de menor constante dielétrica, foi capaz de dessorver maior quantidade de água tritiada (T_2O) da superfície da quimiotripsina e subtilisina do que a dimetilformamida (DMF), que tem uma constante dielétrica maior ($\epsilon = 37,0$). Eles sugeriram que esse comportamento é devido ao metanol não apenas dessorver T_2O das enzimas, mas que este também substitui o T_2O em suas estruturas, uma vez que o metanol tem sua estrutura química mais parecida com a água que o DMF. Portanto, o metanol tem maior efeito perturbador na enzima que o DMSO. Entretanto ainda há desacordo na sequência de *PTS* (citada acima) entre os monoalcoóis, pois o sistema propanol deveria possuir maior *PTS* uma vez que tem menor constante dielétrica (menor perturbador da camada de hidratação da α -tripsina).

A fim de compreendermos melhor o processo de diminuição de atividade da α -tripsina nos sistemas aquo-orgânicos metanol e DMSO, outros parâmetros devem ser adicionados a análise. Assim na Figura 8, na região de transição (T) que vai de 33 a 70% v/v de solvente orgânico o C_m e o CI (Tabela 1) são parâmetros que variam com a adição de diferentes solventes orgânicos. Os resultados desses parâmetros mostraram a seguinte sequência, $DMSO < \text{metanol} = \text{propanol} < \text{etanol}$. Comparando a sequência do *PTS* com C_m , nota-se a inversão na sequência do metanol pelo DMSO.

Para entendermos essa inversão é necessário analisarmos os valores do índice de cooperatividade (CI), que está relacionado com a transmissão de informação de perda de atividade na estrutura da enzima (Tabela 1). Assim, percebemos a seguinte sequência: metanol=etanol<propanol <DMSO. Logo, apesar do sistema solvente metanol possuir o menor PTS , este é menos cooperativo, ou seja, neste sistema solvente, a α -tripsina inicia o processo de perda de atividade primeiro, mas necessita de uma concentração maior de solvente a fim de levar a enzima a 50% de sua atividade, por isso o seu C_m é maior em comparação com o sistema solvente DMSO, que possui maior cooperatividade. Raciocínio semelhante pode ser usado para interpretar a comparação de propanol e metanol em relação aos parâmetros PTS , ou seja, o parâmetro cooperatividade influencia na medida do parâmetro C_m .

Apesar de termos encontrado uma correlação entre a constante dielétrica do DMSO com seus valores de C_m e CI na atividade enzimática da α -tripsina, não foi encontrada correlação entre constantes dielétricas dos alcoóis (metanol, etanol, propanol) com os parâmetros obtidos neste experimento. Resultado semelhante foi encontrado por Duman e col (2014), que observaram também a não correlação entre o aumento ou diminuição da atividade catalítica da protease alcalina do *Bacillus calussii*, com o aumento do número de átomos de carbono de monoálcoois (diminuição da constante dielétrica).

Os resultados apresentados na Figura 8 e Tabela 1, demonstram que a queda abrupta na atividade da enzima é dependente do tipo e da concentração de solvente orgânico. Em geral, a escolha do sistema mais estável é feita a partir de um único parâmetro, C_m (KHMELNITSKY et al., 1991b; MOZHAEV VADIM et al., 1989). No entanto, como demonstrado acima para dois casos diferentes, este parâmetro não pode ser exclusivamente utilizado, uma vez metanol e propanol não apresentam valores estatisticamente diferentes em relação ao C_m . Assim, a escolha do sistema enzima solvente aquo-orgânico mais estável foi baseado na ordem de parâmetro PTS e C_m , por isso, o sistema enzimático aquo-etanol foi escolhido para testes subsequentes.

5.4 Efeito da concentração do etanol na estabilidade conformacional da α -tripsina a 25 °C.

A fim de entender o efeito do sistema aquo-etanol sobre a atividade da α -tripsina, tornou-se necessário investigar se havia variação nas propriedades estruturais com adição do solvente orgânico. A técnica utilizada para monitorar a alteração conformacional proteica induzida quimicamente foi espectroscopia de varredura no UV. Esta técnica baseia-se no princípio de que os resíduos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano encontram-se voltados para o interior da proteína em seu estado nativo (Figura 9). Assim a desnaturação de uma proteína em meio polar (monitorada indiretamente pela exposição dos resíduos aromáticos interiorizados) seguida por uma mudança espectroscópica no λ_{max} e absorção máxima para Phe, Tyr e Trp, ou seja, o λ_{max} tende a sofrer um deslocamento para comprimentos de onda maiores e a absorção dos resíduos tendem a diminuir (SCHMID, 2001). No caso da tripsina, ela contém três fenilalaninas, quatro triptofanos e dez tirosinas (Figura 9).

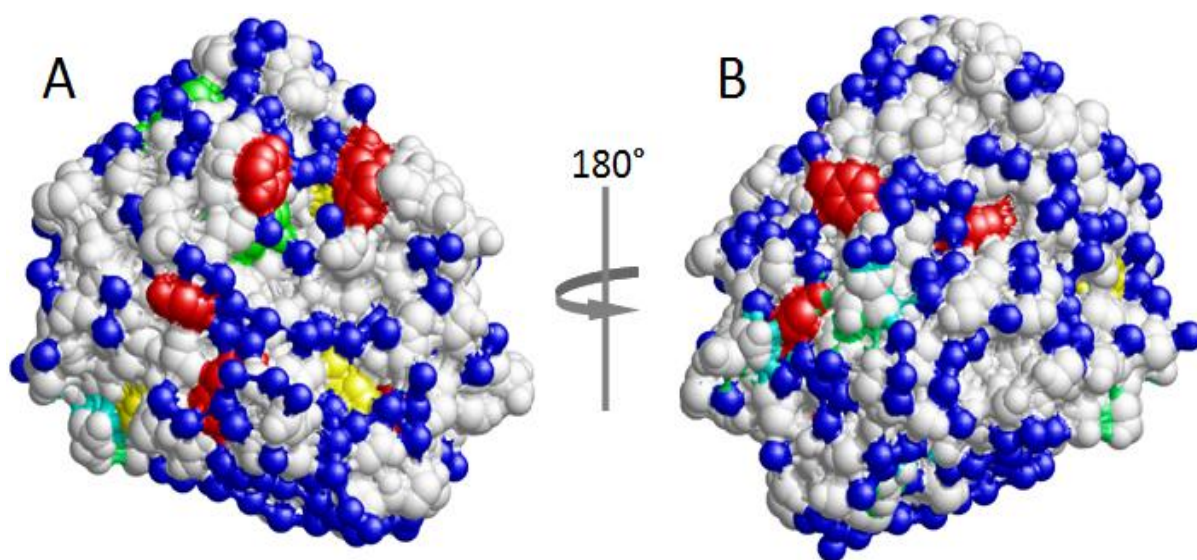


Figura 9: Posição dos resíduos aromáticos da β -tripsina (5ptp.pdB): Com 3 fenilalaninas (verde), 4 triptofanos (amarelo), 10 tirosinas (vermelho) e água (azul) As Imagens estão em spacefill e foram geradas pelo programa Rasmol®. (a) Mostra um face da molécula e (b) outra face após giro na vertical de 180°.

A fim de obter as varreduras espectrais de 260 a 310 nm, o espectrofômetro foi ajustado para resolução e passo de 1 nm com velocidade de varredura de 600 nm/min com 10 aquisições. Essa combinação de parâmetros otimizada permitiu

monitorar as mudanças espectrais ocorridas no processo de desnaturação. Estes resultados vindos desta aquisição foram passíveis de análise por segunda e quarta derivada do gráfico, bem como a mudança na intensidade de absorção.

Os espectros coletados foram analisados conforme (RAGONE et al., 1984) e (PATROS et al., 1982) para a análise por segunda e quarta derivada, respectivamente, onde analisou-se o deslocamento do pico máximo de absorção para cada resíduo aromático. Entretanto, esta técnica foi abandonada devido ao fato de que os picos resultantes da segunda e quarta derivadas não estarem bem definidos e apresentarem deslocamentos insignificantes de comprimento de onda entre os estados nativo e desnaturado.

Outra opção de análise foi monitorar a mudança na intensidade de absorção dos resíduos de Phe, Tyr e Trp da α -tripsina em função do aumento da concentração de etanol e estes resultados estão dispostos na Figura 10. Nesta figura não é mostrado o perfil do aumento da concentração de etanol sobre a estrutura da α -tripsina para o aminoácido triptofano, visto que praticamente não houve diferença na absorção com a adição de etanol. Uma explicação molecular para este fato é que os quatro resíduos existentes na enzima em questão já estão próximos à superfície e o deslocamento dos mesmos é pequeno, provocando assim pequenas mudanças no perfil espectroscópico (Figura 9).

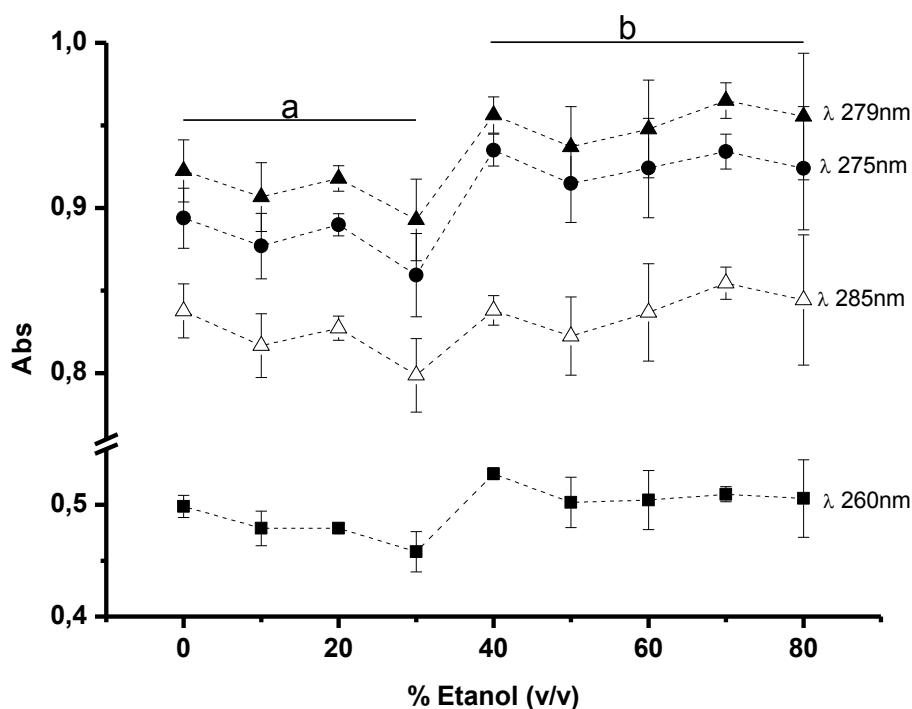


Figura 10: Absorção dos resíduos aromáticos: tirosina (279 nm ▲, 275 nm ●, 285 nm), e fenilalanina (260 nm ■) da isoforma α -tripsina em função da concentração de solvente orgânico (0-80%, v/v). Os dados foram expressos como média ($n=3$) \pm desvio padrão.

Os resultados da Figura 8 mostraram que existe uma diminuição na atividade da enzima em função da concentração de etanol, porém não nos fornece nenhuma explicação molecular do fenômeno. A fim de testar a hipótese de que esta diminuição da atividade é relacionada com uma mudança estrutural foram realizados testes espectroscópicos. Aparentemente os resultados da Figura 10 mostram uma sigmoide com uma inclinação suave, onde se tem um patamar de 0 a 30% v/v (a) e outro de 40 a 80% v/v (b) de etanol. Apesar das aparências, ambos os patamares não são significativamente diferentes (t-Test $p < 0,05$). Portanto, a adição de até 80 % v/v de etanol na α -tripsina monitorada por espectroscopia UV para os resíduos de Tyr e Phe não alterou de forma significativa a estrutura da α -tripsina, ou as mudanças conformacionais foram pequenas e método usado para verificar esta informação não foi sensível o suficiente. Porém, nossos resultados estão de acordo com Guinn e col. (1991) que investigaram o efeito do sistema aquo-orgânico (mistura de DMF e DMSO 9:1 v/v) sobre a estrutura da tripsina comercial utilizando

espectrometria de fluorescência, e os autores observaram que não houve grandes mudanças na estrutura da proteína até a adição de 70% v/v de solvente orgânico.

Seguindo este raciocínio, podemos sugerir que os nossos resultados espectroscópicos comparando o estado nativo e desnaturado em função da concentração de solvente orgânicos foram similares devido ao deslocamento dos resíduos do interior da proteína ou "core hidrofóbico" (com característica apolar) para uma superfície não tão polar quanto a água (Tabela 2) fez com que a mudança espectroscópica não fosse tão significativa. Assim, de acordo com nossos resultados tornou-se necessária a utilização de outras técnicas para elucidar o efeito do etanol sobre a atividade da α -tripsina.

5.5 Efeito do CaCl_2 na atividade amidásica da α -tripsina no sistema aquoso e etanol-aquoso 60% v/v.

A fim de verificar o efeito de cloreto de cálcio, a atividade amidásica da α -tripsina foi avaliada no sistema tampão composto por, tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 8,0 e no sistema etanol-tampão 60% v/v. Para que fosse excluído o efeito da absorção diferencial do 4-nitroalínia em diferentes solventes, o coeficiente de extinção molar (ϵ) do cromóforo 4-nitroanilina para ambos os sistemas foi calculado. Esse parâmetro (ϵ) é o resultado da inclinação da reta do gráfico absorvância *versus* concentração de 4-nitroanilina e os resultados obtidos foram 8000M⁻¹ cm⁻¹ e 9355M⁻¹ cm⁻¹ para a 4-nitroanilina em tampão e etanol-tampão 60% v/v, respectivamente (Figura 11A e B). Assim as atividades enzimáticas foram calculadas utilizando equação 2.

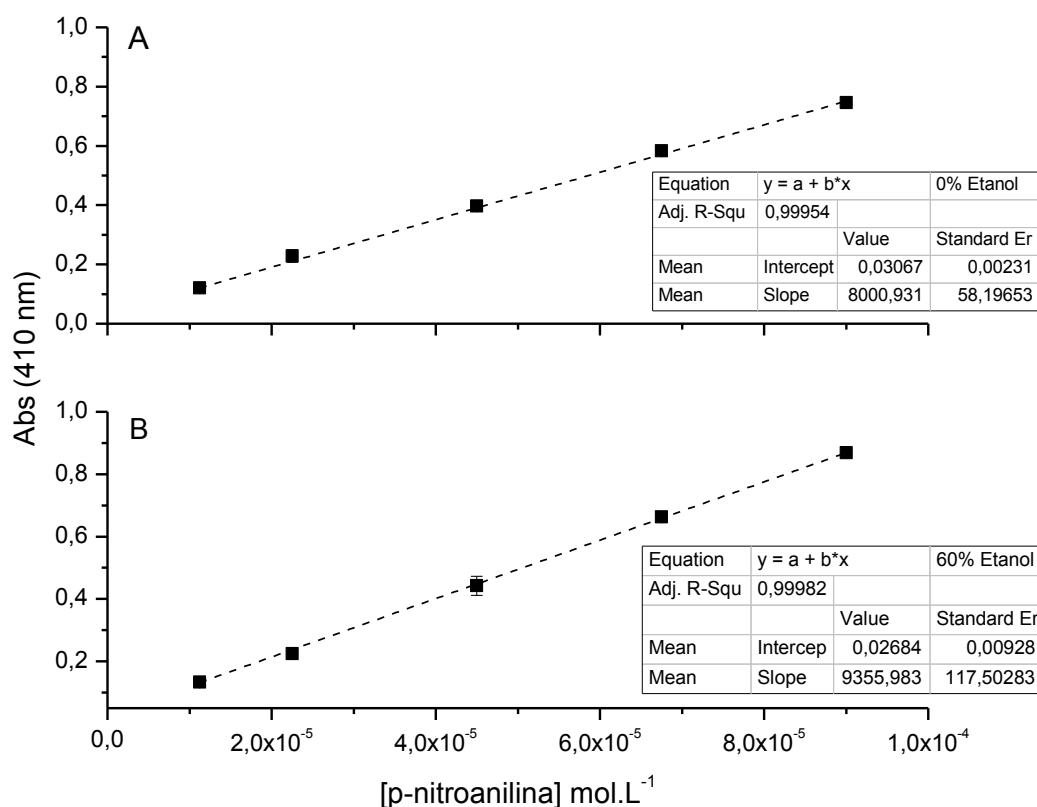


Figura 11: Curva padrão para obtenção do coeficiente de extinção molar (ϵ) da 4-nitroanilina. A figura (A) corresponde ao sistema solvente tampão composto por: tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 8,0. A figura (B) a etanol-tampão 60% v/v. Os dados foram expressos como média (n=3) \pm desvio padrão.

O efeito de íons metálicos sobre a atividade das isoformas de tripsina é bem conhecido e pode variar conforme a isoforma estudada (BODE; SCHAWAGER, 1975; CHIANCONE et al., 1985). Entretanto, não é muito comum a avaliação de íons metálicos sobre atividade da isoforma α -tripsina em meio aquo-orgânico.

A Figura 12 apresenta os resultados da atividade amidásica da α -tripsina em meio aquoso e aquo-orgânico (etanol-tampão 60% v/v) frente à adição de diferentes concentrações de CaCl₂. A análise dos perfis de atividade nesta figura mostram que a enzima apresenta perfis catalíticos semelhantes em ambos os sistemas solventes, mostrando assim que não houve quaisquer mudanças permanentes no sistema proteico. Nos dois sistemas, o perfil enzimático desenha uma gaussiana com o máximo de atividade em 20 mmol.L⁻¹ de cloreto de cálcio e acima desta concentração a atividade começa a diminuir (ABBOTT et al., 1975).

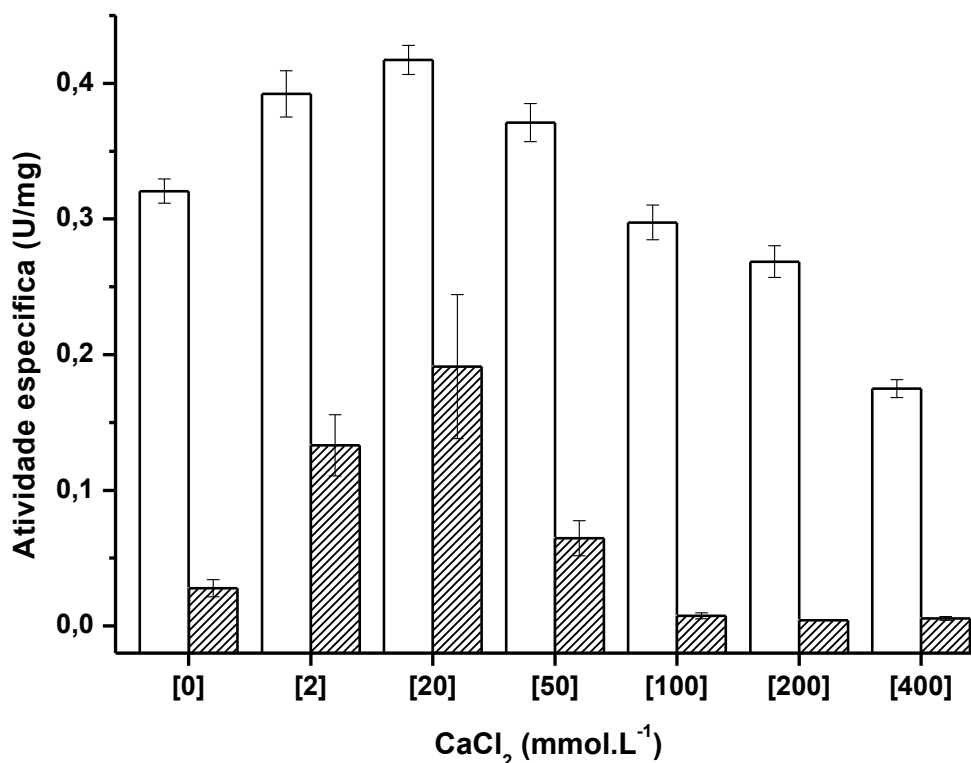


Figura 12: Atividade amidásica específica da α -tripsina em função da adição de CaCl_2 em meio aquoso composto por tampão tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 8.0 (□) e aquo-orgânico etanol-tampão 60% v/v (▨). O cromóforo foi detectado a 410 nm. Os dados foram expressos como média ($n=3$) \pm desvio padrão.

O aumento da atividade da enzima observado na parte ascendente da gaussiana, ou seja, de 0 até 20 mmol.L⁻¹, é tipicamente conhecido. Nesta concentração o íon metálico provoca um aumento na atividade enzimática da tripsina, diminuindo a autólise e aumentando sua estabilidade (GORINI, 1951; NORD; BIER, 1953). Lazdunski e Delaage (1965) sugerem que quando o íon de cálcio se liga ao seu sítio na proteína, ocorre uma mudança conformacional tornando-a menos susceptível a autólise. Essa mudança gera uma molécula mais compacta e mais estável.

Uma das possíveis explicações da diminuição da atividade enzimática observada na parte descendente da gaussiana (50 a 400 mmol.L⁻¹) é o aumento da concentração dos íons Ca^{2+} e Cl^- que podem favorecer a agregação e diminuir o número de moléculas disponíveis para realizar a catálise ou aumentar a

porcentagem de moléculas desnaturadas, que em consequência aumentam a taxa de autólise. Esta hipótese de agregação de proteínas é sustentada pela teoria da série de Hofmeister (LEBERMAN, 1991) apresentada na Figura 13, onde pode-se observar que os íons Ca^{2+} e Cl^- são desestabilizantes. Contudo, a concentração do íon necessária para exercer esse efeito é dependente das características de cada proteína. Um dos efeitos destes íons desestabilizantes, também chamados de agentes caotrópicos, é promover a desnaturação proteica a partir de determinada concentração. Eles interagem preferencialmente com a proteína fazendo com que seja exposta uma maior área interfacial entre proteína-solução provocando a desnaturação desta que é energeticamente mais desfavorável. Assim uma das maneiras para o sistema proteína-solução-íons alcançar um estado energético de menor energia (estado enovelado) para estabilizar-se é conjugar-se com outra proteína (agregar) a fim de que seu “core” hidrofóbico não seja exposto à superfície polar.

SÉRIE DE HOFMEISTER

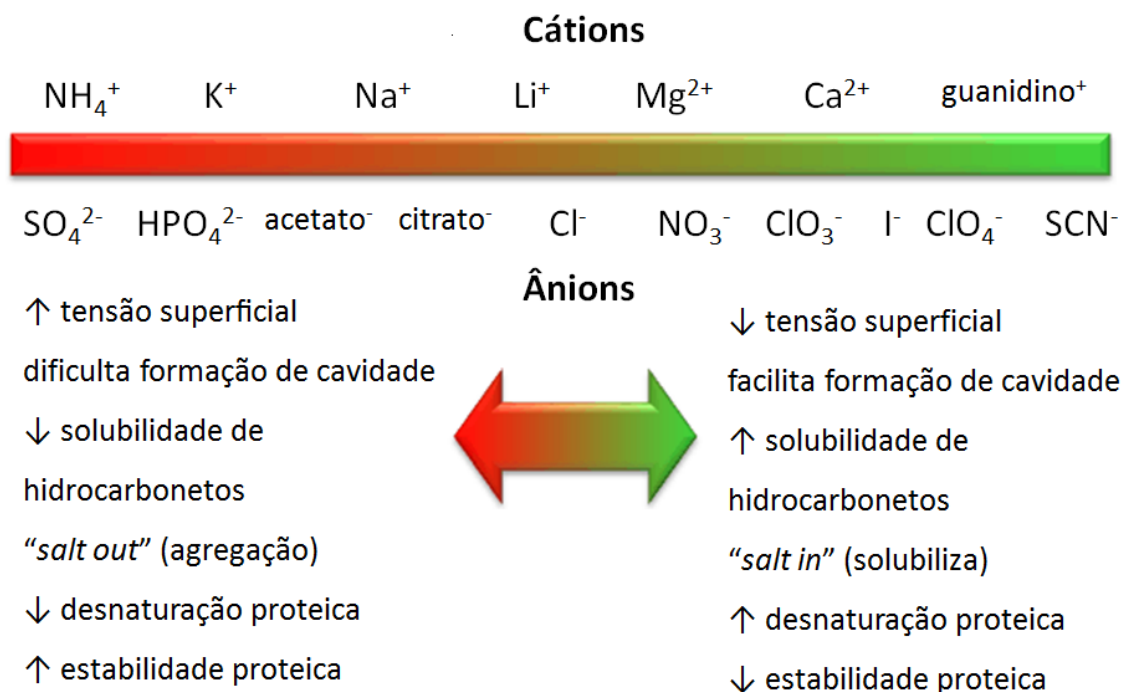


Figura 13: Série de Hofmeister, (JAKUBOWSKI, 2013)

Apesar do CaCl_2 estabilizar ou aumentar a atividade da α -tripsina, os seus íons possuem característica caotrópica. Em concentrações mais baixas, os íons

Ca^{2+} estariam se ligando preferencialmente ao sítio de cálcio que esta proteína possui levando a uma conformação mais estável ou diminuindo a taxa de autólise como descrito por Lazdunski e Delaage (1965), porém com aumento da concentração destes íons a relação cálcio/sítio aumenta e assim o efeito caotrópico passa a predominar. Toda essa discussão sobre a influência dos íons na atividade é válida também para o sistema etanol-tampão-proteína-íon. Entretanto, nesse sistema apenas 50% das moléculas proteicas encontram-se no estado nativo, uma vez que o teste de atividade foi realizado no C_m .

5.6 Estabilidade térmica da α -tripsina em sistema etanol-tampão 60% v/v.

O perfil de estabilidade térmica em função do tempo e temperatura para isoforma α -tripsina (Figura 14) foi monitorado pela liberação de produto formado (4-nitroanilina) em sistema tampão composto por tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 8,0 com 20 mmol.L⁻¹ de CaCl_2 e etanol-tampão 60% v/v.

Como pode ser visto na Figura 14, no sistema proteína-tampão, mostrado pelos símbolos abertos, a quantidade máxima de produto formado foi alcançada após 20 minutos de reação à temperatura de 318,15 K (45°C) e a mínima a 298,15 K (25°C). Nas reações químicas de uma forma geral, o aumento da temperatura favorece ao aumento da velocidade de reação, uma vez que este incremento na temperatura aumenta a energia cinética média das moléculas do sistema. Considerando os resultados de Santos e col. (2008a), onde a 315,15 K a α -tripsina ainda se encontra na região de pré-transição, ou seja, as moléculas estão $\cong 100\%$ no estado nativo, consequentemente a 318,15 K a atividade catalítica da enzima foi máxima.

Se considerarmos o T_m de 325,9 K para α -tripsina (SANTOS et al., 2008a), ou seja, temperatura onde 50% das moléculas estão no estado desnaturado, espera-se que próxima a esta temperatura, 328,15 K (55°C), a quantidade de produto formado em 30 minutos esteja próximo da metade da quantidade máxima, o que pode ser visto na Figura 14. Contudo, nas temperaturas de 338,15 K (65°C) e 348,15 K (75°C) onde as moléculas da proteína estão na região de pós-transição segundo os resultados de SANTOS et al. (2008a), a quantidade de produto formado foi mínima,

pois, em temperaturas elevadas ocorre desnaturação enzimática devido ao rompimento de interações fracas responsáveis pela manutenção da estrutura tridimensional, o que leva à perda de atividade (KUMAR; VENKATESU, 2012).

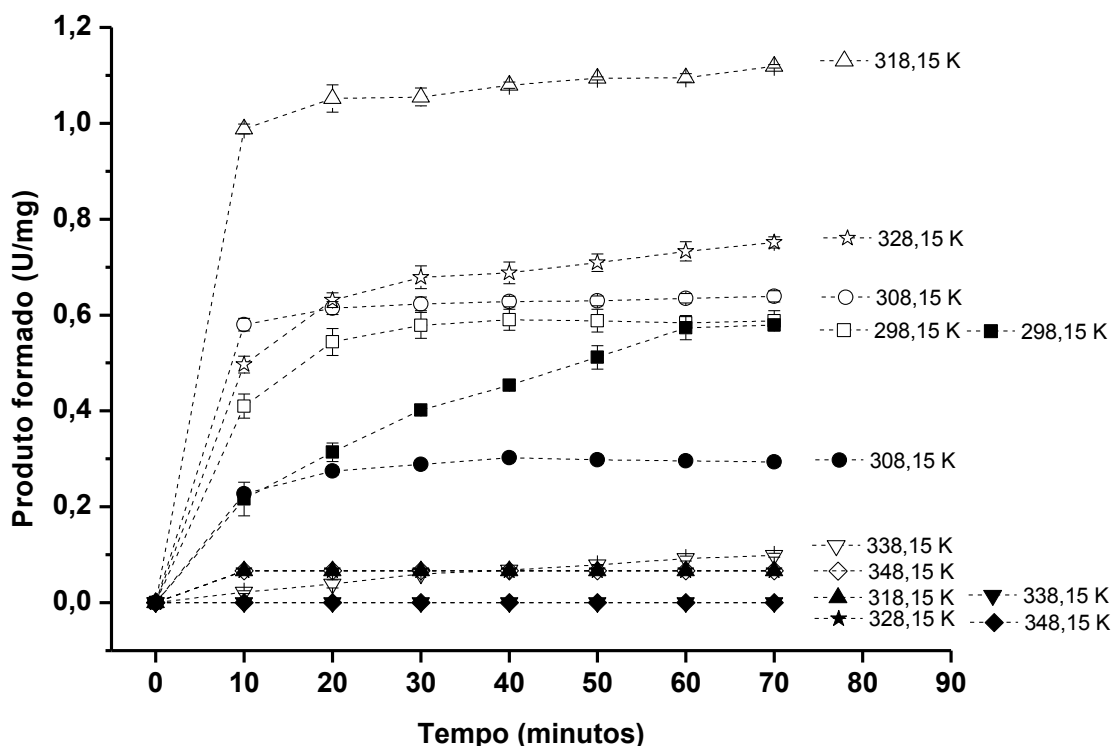


Figura 14: Quantidade de 4-nitroanilina (lida a 410 nm) formada em função do tempo e temperatura, utilizando a isoforma α -tripsina e BA ρ NA como seu substrato. Os símbolos abertos estão relacionados com α -tripsina em tampão tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 8,0 contendo CaCl₂ a 20,0 mmol.L⁻¹ e os símbolos fechados estão relacionados com α -tripsina em etanol-tampão 60% com as temperaturas indicadas em K. Os dados foram expressos como média (n=3) \pm desvio padrão. As linhas pontilhadas são apenas para guiar os olhos, não sendo realizado nenhum ajuste matemático.

Entretanto, na Figura 14 pode-se observar que no sistema etanol-tampão-proteína, representado pelos símbolos fechados, toda quantidade de produto formado em temperaturas diferentes foi inferior em comparação com o sistema tampão-proteína. Sendo que a partir de 318,15 K (45 °C) a quantidade de produto formado foi mínima. No teste a 298,15 K (25 °C), a mesma quantidade máxima de produto formado foi alcançada no sistema proteína-tampão em 20 minutos, porém no sistema proteína-etanol-tampão em 60 minutos. Se considerarmos que o etanol

está diminuindo a quantidade de moléculas no estado nativo através do processo de desnaturação seguido de processos irreversíveis (agregação e outros), o tempo para se alcançar o rendimento máximo será maior como foi observado na Figura 14. Nesta figura, a 308,15 K (35 °C), ambos os sistemas apresentam perfis semelhantes, porém com diferença na intensidade, este resultado sugere que o etanol funcione também como inibidor da α -tripsina. Devido a estes resultados tornou-se necessário um estudo envolvendo termodinâmica e cinética para maior entendimento do comportamento da α -tripsina em sistema aquo-orgânico.

5.7 Estudo termodinâmico da α -tripsina em sistema aquo-orgânico por espectroscopia no UV.

Considerando que a estabilidade termodinâmica de uma proteína é a medida de quanto mais estável é sua conformação globular ou nativa em comparação ao seu estado desnaturado (AHMAD; YADAV; TANEJA, 1992; PACE; BREAT A.; JAMES A., 1990) e a fim de verificar a estabilidade termodinâmica da α -tripsina, no sistema tampão e nos sistemas, metanol-tampão 50% v/v, etanol 60% v/v e propanol-tampão 49% v/v, as amostras foram submetidas a varredura espectral no UV monitorando absorbância do resíduo de Tyr e os resultados estão na Figura 15. Este resíduo aromático respondeu melhor às análises uma vez que os mesmos estão voltados mais para o interior da molécula proteica e se apresentam em maior número (Figura 9). Os dados brutos apresentaram uma forma sigmoidal e as as curvas (Figura 15) exibem três fases, pré-transição, transição e pós-transição e o perfil observado foi característico de uma transição cooperativa entre dois estados (PRIVALOV, 1979). A linha pontilhada, através dos pontos experimentais, representa a curva ajustada, de acordo com o modelo Boltzmann (equação 1) e α -tripsina apresentou $\cong 96\%$ de reversibilidade em sistema tampão.

Todas as análises termodinâmicas neste trabalho são modelo dependente e todas as transições térmicas foram assumidas como a relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH} \cong 1$. Sendo assim, as leituras espectroscópicas obtidas podem ser utilizadas para determinar os parâmetros termodinâmicos e considerar que o ΔH_{vH} calculado é igual ao ΔH_{cal} (PACE; SHIRLEY; THOMSON, 1990).

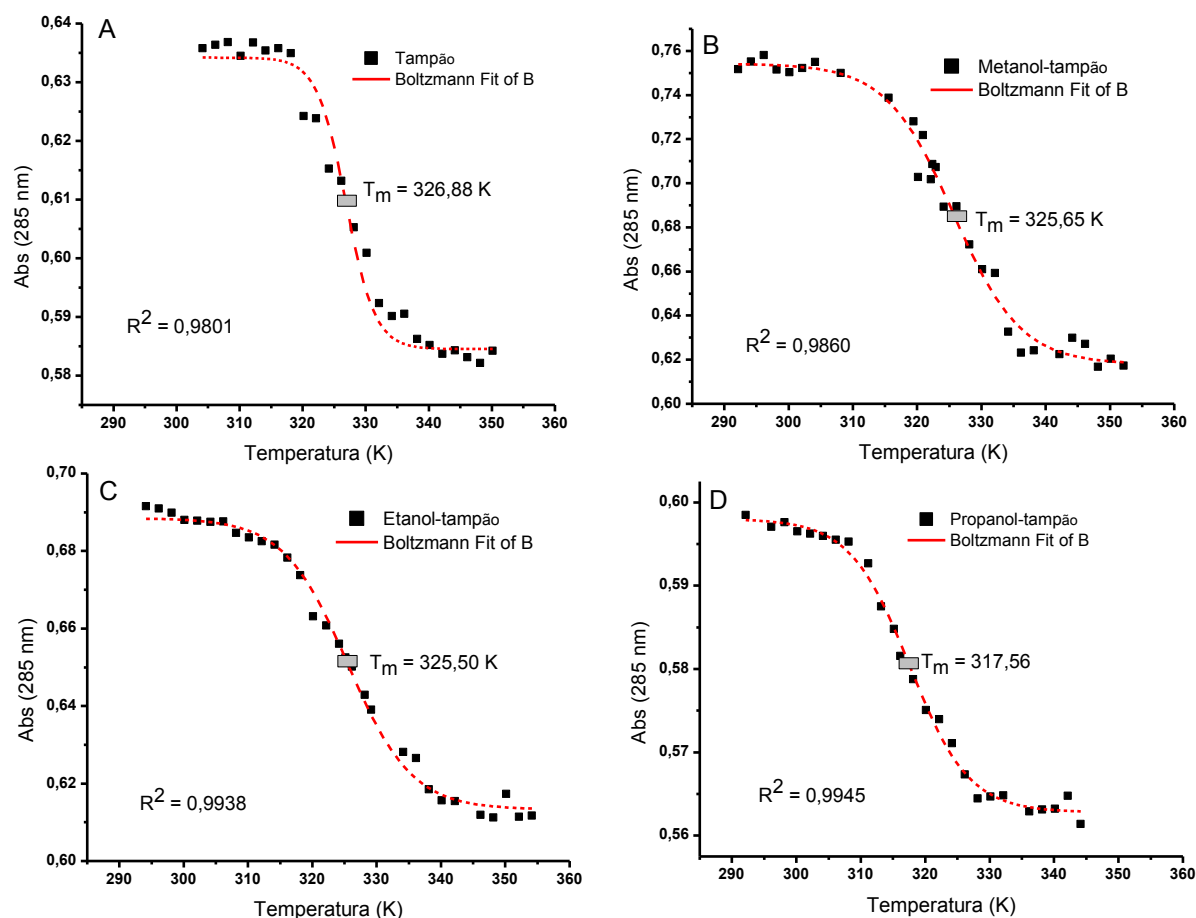


Figura 15: Curvas de desnaturação térmica de α -tripsina ($0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$) em tampão: glicina 100 mmol.L^{-1} , pH 3,0 com cloreto de cálcio 20 mmol.L^{-1} monitorada por UV no comprimento de onda de 285 nm. (A), metanol-tampão 50% v/v (B), etanol-tampão 60% v/v (C), propanol-tampão 49% v/v (D), em diferentes temperaturas (292,15–352,15 K). Os dados brutos foram ajustados no modelo matemático de Boltzmann. T_m é a temperatura média de desnaturação. São mostrados os seus respectivos coeficientes de correlação R^2 .

Como pode ser observado na Tabela 3, os valores de T_m , ΔH e ΔS_{T_m} para α -tripsina em meio aquoso foram os similares ao obtidos por Santos et al. (2008a) pela técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC), ou seja, $T_m = 325,9 \text{ K}$, e $\Delta H = 414,24 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e ΔS_{T_m} de $1,25 \text{ KJ.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$. Esta similaridade de valores em trabalhos diferentes é mais uma confirmação de que a entidade molecular na qual se está trabalhando é a α -tripsina. O valor do T_m encontrado neste trabalho apresentou uma diferença de apenas 1K, sendo este valor considerado muito pequeno visto que todo experimento foi realizado com banho externo de aquecimento.

Tabela 3: Parâmetros termodinâmicos α -tripsina em pH 3,0

Sistema solvente	T_m (K) ^a	ΔH_{T_m} (kJ mol ⁻¹) ^b	ΔS_{T_m} (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹) ^c	CI (K ⁻¹) ^d	PTS (K) ^e
Tampão	326,88 ± 1,00	386,47 ± 2,15	1,18 ± 0,01	0,109	320
Metanol-Tampão (50% v/v)	325,65 ± 1,00	168,81 ± 2,03	0,52 ± 0,01	0,048	314
Etanol-Tampão (60% v/v)	325,50 ± 1,00	176,29 ± 3,11	0,55 ± 0,01	0,050	314
Propanol-Tampão (49% v/v)	317,14 ± 1,00	178,09 ± 2,05	0,56 ± 0,01	0,053	308

^aTemperatura onde 50% das moléculas de proteína estão no estado nativo.

^bEntalpia de transição no T_m .

^cEntalpia de transição no T_m .

^dÍndice de cooperatividade é inversamente proporcional a variação de temperatura na curva de transição ($1/\Delta T$).

^eInício da pré-transição.

Baseando no conceito de estabilidade em função do T_m , a análise da Figura 15 e da 15 e da

Tabela 3 mostram a seguinte relação: Sistema tampão=Metanol>Etanol>Propanol. Uma interessante observação é que a cooperatividade medida durante a desnaturação térmica também influenciou o parâmetro T_m , assim como foi observado na perda de atividade induzida por solvente na Figura 8. Um exemplo claro desta influência pode ser visto quando se compara o sistema tampão com o sistema etanol-tampão, onde o sistema tampão possui um PTS de 320 K e o sistema etanol-tampão de 314 K. Assim, era esperado que T_m do etanol- tampão fosse menor que o do sistema tampão, porém como o parâmetro cooperatividade para o sistema etanol-tampão é aproximadamente duas vezes menor que o do sistema tampão existe um deslocamento do T_m para um valor maior que o esperado.

O fato da cooperatividade ser menor para o sistema etanol-tampão faz com que exista um ajuste na curva de desnaturação térmica, devido a inclinação na região de transição ser menor para o sistema etanol-tampão, fazendo com que o T_m dos dois sistemas comparados sejam similares.

Como pode ser observado na Tabela 3, analisando o sistema Tampão; metanol e etanol, ambos apresentaram T_m semelhantes, ou seja, estabilidade termodinâmica similar considerando o T_m . O efeito da adição do solvente ao sistema tampão não mostrou mudança significativa na estrutura da proteína, já que o T_m é uma propriedade intensiva. Porém, quando observa-se a Tabela 3 nos valores de ΔH_{T_m} , nota-se que os mesmos para toda a série homologa são em média 55% menores quando comparados ao sistema tampão. Este resultado é interessante para explicação molecular da diminuição da atividade observada na Figura 8, visto que o ΔH é uma propriedade extensiva, ou seja, dependente da concentração ou do número de moléculas. Assim, a diminuição significativa do valor de ΔH_{T_m} para série alcoólica homologa demonstra que o número de moléculas nativas que sofreram o processo de desnaturação térmica foi menor. Esta quantidade menor de moléculas nativas pode ter sido ocasionada devido a algum processo irreversível como, por exemplo, agregação (KUMAR; VENKATESU, 2012). Deste modo, estes resultados sugerem que a adição de solvente orgânico atua na diminuição do número de moléculas nativas.

A análise dos outros parâmetros termodinâmicos como PTS demonstrou que na série alcoólica a ordem foi sistema tampão>Metanol=Etanol>Propanol. Este parâmetro é de fundamental importância quando analisado em conjunto com o T_m e ΔH_{T_m} . Ambos podem fornecer indicação do melhor sistema a ser escolhido. A análise do ΔS_{T_m} demonstra que a adição dos solventes orgânicos tende a organizar o sistema, ou seja aumentar a entropia da cadeia proteica e diminuir a do solvente, visto que a ordem decrescente deste parâmetro foi a seguinte tampão>Metanol \cong Etanol=Propanol.

Apesar das propriedades termodinâmicas citadas acima poderem ser relacionadas diretamente aos resultados obtidos neste trabalho, o sistema propanol-tampão teve seu T_m diminuído em comparação ao valor do sistema tampão. Esta discrepância em relação aos outros resultados pode ser sugerida devido ao fato de

que o propanol possui uma constante dielétrica e momento dipolo significativamente diferente dos outros monoalcoóis estudados (Tabela 2), além disto, ele é o único dos solventes estudados que possui Log P com valor positivo (Tabela 2). Estes parâmetros físico-químicos citados sugerem que o propanol atua de maneira diferente dos outros monoalcoóis no processo de desnaturação proteica, ou seja, ele interage preferencialmente com o "core" hidrofóbico.

5.8 Estudo cinético da α -tripsina em sistema tampão e etanol-tampão 60% v/v a 25 °C.

A fim de investigar o efeito do etanol sobre a atividade amidásica da α -tripsina um estudo de cinética química foi realizado. O perfil da atividade amidásica da α -tripsina em tampão composto por tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 8,0 com 20 mmol.L⁻¹ de CaCl₂ e etanol-tampão 60% v/v utilizando BApNA como substrato é mostrado na Figura 16. As curvas de cinética química foram obtidas através do tratamento dos dados brutos ajustados seguindo o modelo de Michaelis-Menten utilizando o software GraphPad Prism 5.0. A Figura 16 mostra um perfil clássico de uma enzima que está sofrendo o processo de inibição. Esse resultado está em conformidade com Miles et col (1962) que utilizando α -quimiotripsina em solventes orgânicos, concluíram que estes atuam como inibidor.

A fim de definir qual tipo de inibição causada pelo etanol, os parâmetros dispostos na Tabela 4 foram comparados. Os valores de K_m para α -tripsina em ambos os sistemas solventes permaneceram estatisticamente iguais (Tabela 4), entretanto os valores de V_{max} , para α -tripsina em etanol-tampão 60% v/v tiveram uma redução considerável (Tabela 4), mostrando que a α -tripsina está sofrendo um processo de inibição não competitiva. Este resultado está de acordo com Duman e col (2014), que concluíram que os solventes orgânicos podem afetar a velocidade da reação enzimática alterando os parâmetros cinéticos, por meio de interações específicas.

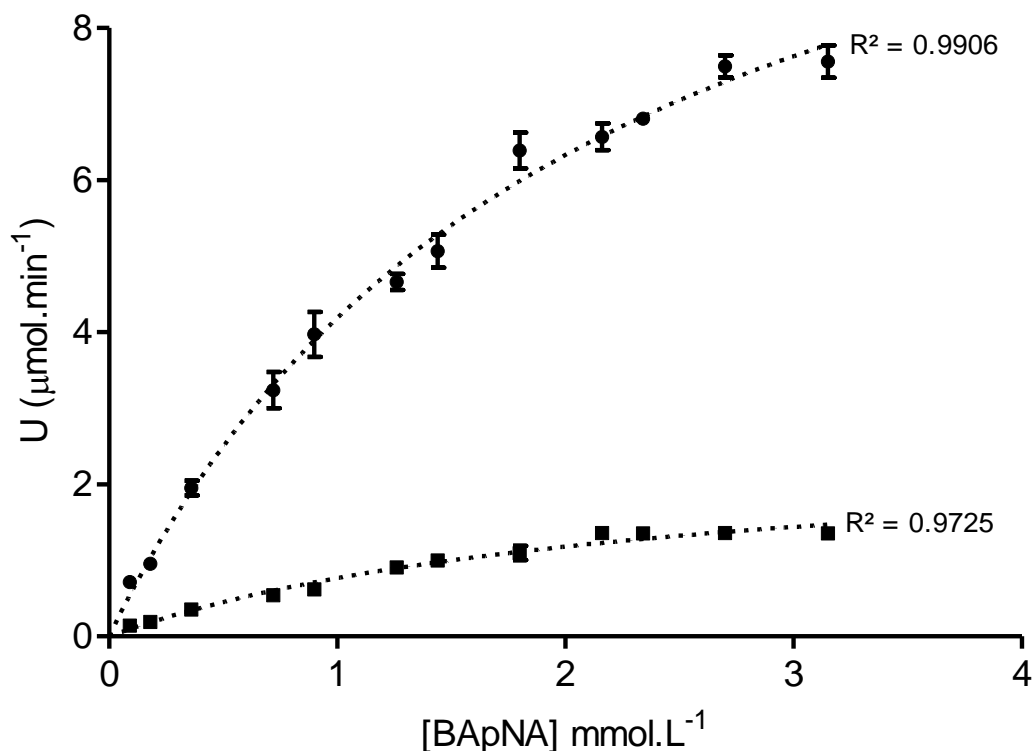


Figura 16: Efeito da concentração do substrato BApNA na atividade da reação catalisada pela enzima α -tripsina a 298,15 K. (●) Tampão composto por tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH8,0 com 20 mmol.L⁻¹ de CaCl₂. (■) Etanol-tampão 60%v/v. Os dados foram expressos como média (n=3) \pm desvio padrão.

Com a finalidade de entendermos melhor esse mecanismo de inibição vamos analisar constante catalítica k_{cat} , (Tabela 4) ou número de renovações (*turnover number*) que é definido como o número máximo de moles de substrato que podem ser convertidos em produto por mol de enzima na unidade de tempo (WILSON; WALKER, 2010). Sendo assim, a diminuição do k_{cat} foi devida à inibição provocada pelo etanol que diminuiu a concentração do complexo enzima substrato [ES] através da redução da concentração da enzima livre [E] pela reação 1 (Figura 17) e da diminuição do complexo [ES] através da reação 2 (Figura 17).

Tabela 4: Parâmetros cinéticos da tripsina em meio aquo-orgânico, a 298 K

Sistema solvente	K_M (μM)	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$)	K_{cat} (min^{-1})	K_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
*Tampão	$2,12 \pm 0,16$	$14,34 \pm 0,57$	26,7	12,6
Etanol-tampão 60% v/v	$2,39 \pm 0,33$	$2,57 \pm 0,19$	12,0	0,5

*Tampão tris-HCl 100 mmol.L⁻¹, pH 8,0 contendo CaCl₂.

Desta forma, os valores k_{cat}/K_M que é conhecido como uma medida de eficiência da catálise enzimática diminui aproximadamente 24 vezes (Tabela 4) em relação ao sistema tampão, mostrando a perda de eficiência catalítica da enzima no sistema etanol-tampão.

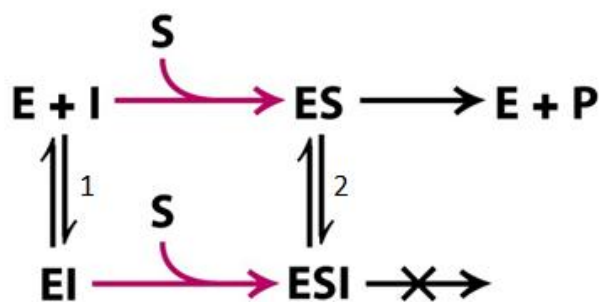


Figura 17: Esquema de inibição não competitiva (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002).

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados sobre a diminuição da atividade amidásica da isoforma α -tripsina em meios aquo-organicos na série homologa de alcoois principalmente no sistema etanol-tampão 60% mostrou que a maioria das propriedades físico-químicas analisadas para α -tripsina não mudam substancialmente. Ou seja não foi observada mudança significativa em relação a: mudança conformacional, perfil de atividade em função da concentração de CaCl_2 e T_m . No entanto, a clara diminuição da atividade catalítica em função da concentração e do tipo do álcool além das mudanças observadas nos parametros termodinâmicos (ΔH , ΔS , CI e PTS) entre o sistema tampão, etanol-tampão 60% e dos parametros cinéticos demonstram que existe mais de um mecanismo governando a perda de atividade da enzima em solvente orgânico. Nossos dados sugerem que existem dois fatores diminuindo a atividade da enzima, ou seja, a indução química à desnaturação proteica seguida de processos irreversíveis e inibição não competitiva sobre o processo enzimático. Porém estes resultados não nos dizem qual a contribuição quantitativa destes dois fatores. Os resultados deste trabalho experimental são de alta relevância para o entendimento de como a α -tripsina tem sua atividade regulada em presença de solventes organicos, além disso, as propriedades descritas fornecem informações interessantes sobre enzimas para aplicação na indústria de alimentos, detergentes e pesquisa em biocatálise em meios aquo restritos.

7 PERSPECTIVAS

Após a realização deste trabalho várias foram as perguntas que não foram respondidas ou mesmo geraram mais perguntas para serem pesquisadas, assim algumas análises complementares são necessárias como:

- Monitoramento do processo de desnaturação por indução química por espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular e espalhamento de Luz por DLS;
- Determinação do tempo de vida ou “Shelf life” da enzima em sistema etanol-tampão 60%;
- Determinação da taxa de conversão de α em ψ -tripsina em sistema etanol-tampão 60%;
- Determinação completa dos parâmetros termodinâmicos da isoforma alfa tripsina em etanol-tampão 60% por calorimetria diferencial de varredura.
- Realização de toda metodologia experimental de atividade enzimática feita neste trabalho com a atividade esterásica.

8 REFERÊNCIAS

ABBOTT, F. et al. The location of the calcium ion binding site in bovine alpha-trypsin and beta-trypsin using lanthanide ion probes. **Biochemistry**, v. 14, n. 22, p. 4935–4943, 1975.

AFFLECK, R. et al. Enzymatic catalysis and dynamics in low-water environments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 3, p. 1100–4, 1 fev. 1992.

AHMAD, F.; YADAV, S.; TANEJA, S. Determining stability of proteins from guanidinium chloride transition curves. **The Biochemical Journal**, v. 287, p. 481–485, out. 1992.

ASCENZI, P. et al. Steady-state and pre-steady-state kinetics of the trypsin-catalysed hydrolysis of α -CBZ-L-lysine-p-nitrophenyl ester. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 658, n. 1, p. 158–164, 1981.

BABA, T. et al. Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. **The Journal of biological chemistry**, v. 264, n. 20, p. 11920–7, jul. 1989.

BARRETT, D. Zymogen activation as a sensitive enzyme-amplifying assay for a protease with tryptic specificity. **The Biochemical journal**, v. 117, n. 1, p. 57–9, mar. 1970.

BECKTEL, W. J.; SCHELLMAN, J. A. Protein Stability Curves. **Biopolymers**, v. 26, p. 1859–77, 1987.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry, Fifth Edition: International Version**: [s.l.] W. H. Freeman, 2002.

BODE, W.; FEHLHAMMER, H.; HUBER, R. Crystal Structure of Bovine Trypsinogen at 1.8 Å Resolution. I. Data Collection, Application of Patterson Search Techniques and Preliminary Structural Interpretation. **Journal of Molecular Biology**, v. 106, n. 2, p. 325–35, set. 1976.

BODE, W.; SCHWAGER, P. The single calcium-binding site of crystallin bovin beta-trypsin. **FEBS Letters**, v. 56, n. 1, p. 139–143, 1975.

BODE, W.; SCHWAGER, P.; HUBER, R. The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. **Journal of Molecular Biology**, v. 118, p. 99–112, 1978.

BUTLER, L. G. Enzymes in non-aqueous solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 1, p. 253–259, 1979.

CHIANCONE, E. et al. Dynamic and structural properties of the calcium binding site of bovine serine proteases and their zymogens. A multinuclear nuclear magnetic

resonance and stopped-flow study. **Journal of Molecular Biology**, v. 185, n. 1, p. 201–207, set. 1985.

DAVIE, E. W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. **Biochemistry**, v. 30, n. 43, p. 10363–70, out. 1991.

DAVIE, E. W.; NEURATH, H. Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 212, p. 515–29, 1955.

DILL, K. A. et al. The Protein Folding Problem. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular**, v. 37, p. 289–316, 2008.

DORDICK, J. S. Non-aqueous enzymology. **Current opinion in biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 401–7, jun. 1991.

DUMAN, Y. A. et al. Water miscible mono alcohols' effect on the proteolytic performance of *Bacillus clausii* serine alkaline protease. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 469–86, jan. 2014.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of Trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p. 271–278, 1961.

FITZPATRICK, P. A.; KLIBANOV, A. M. How Can the Solvent Affect Enzyme Enantioselectivity ? **American Chemical Society**, v. 113, p. 3166–3171, 1991.

FOUCAULT, G. et al. Comparative study of some conformational properties of α , β and Ψ bovine trypsins . **European Journal of Biochemistry**, v. 56, n. 2, p. 1343–1350, 1974.

FOUCAULT, G.; SEYDOUX, F.; YON, J. Comparative Kinetic Properties of α , β and Ψ Forms of Trypsin. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, p. 295–302, 1974.

FRIDOVICH, I. Some Effects of Organic Solvents on the Reaction Kinetics of Milk Xanthine Oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 3624–3629, 1966.

GORINI, L. Calcium role in trypsin-serum albumin system. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 7, p. 318–334, 1951.

GORMAN, L. A. S.; DORDICK, J. S. Organic solvents strip water off enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, n. 4, p. 392–397, 1992.

GRIMSLEY, G. R.; SCHOLTZ, J. M.; PACE, C. N. A summary of the Measured pKa Values of the Ionizable Groups in Folded Proteins. **Protein Science**, v. 18, p. 247–251, 2009.

GUINN, R. M.; BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. Effect of a water-miscible organic solvent on the kinetic and structural properties of trypsin. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n. 4, p. 320–326, abr. 1991.

HARRIS, T. K. et al. Structural Basis of Perturbed pKa Values of Catalytic Groups in Enzyme Active Sites. **IUBMB Life**, v. 53, p. 85–98, 2002.

HAYNIE, D. T. Gibbs free energy-applications. In: **Biological Thermodynamics**. Cambridge ed. New York: [s.n.]. p. 119–78.

HILSER, V. J. Modeling the native state ensemble in protein structure, stability and folding. In: MURPHY, K. (Ed.). **Methods in Molecular Biology**. Totowa, N J: Human press, 2001. p. 93–116.

JAKUBOWSKI, H. Protein Structure. Disponível em: <<http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/protstructure/olhydrophobp rot.html>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

KHMELNITSKY, Y. L. et al. Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 12, p. 710–724, dez. 1988.

KHMELNITSKY, Y. L. et al. Relationship between surface hydrophilicity of a protein and its stability against denaturation by organic solvents. **FEBS letters**, v. 284, n. 2, p. 267–269, 1991a.

KHMELNITSKY, Y. L. et al. Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. **European Journal of Biochemistry**, v. 198, n. 1, p. 31–41, 23 maio 1991b.

KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 14, n. 4, p. 141–4, abr. 1989.

KUMAR, A.; VENKATESU, P. Overview of the stability of α -Chymotrypsin in different solvent media. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 4283–4307, 2012.

LAANE, C. et al. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 1, p. 81–87, 1987.

LAZDUNSKI, M.; DELAAGE, M. On the reactivity of ionisable functions of bovine and porcine trypsinogens. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 105, p. 541–561, 1965.

LEBERMAN, R. The Hofmeister series and ionic strength. **FEBS letters**, v. 284, n. 2, p. 293–4, 24 jun. 1991.

LESK, A. M. Evolution in selected proteins families. In: **Introduction to Protein Architecture**. Oxford Uni ed. Oxford: [s.n.]. p. 204–16.

LESK, A. M.; FORDHAM, W. D. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. **Journal of Molecular Biology**, v. 258, n. 3, p. 501–37, maio 1996.

LIGHT, A.; HIGAKI, J. N. Detection of intermediate species in the refolding of bovine trypsinogen. **Biochemistry**, v. 26, n. 17, p. 5556–5564, 1987.

LIMA, W. O.; AGNES, L. **Biocatálise em meios aquo-restritos: Fundamentos e aplicações em Química analítica**, 1999.

MAROUX, S.; ROVERY, M.; DESNUELLE, P. Hydrolysis by bovine trypsin of some aromatic bonds in high molecular weight peptides. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 122, p. 147–150, 1966.

MAROUX, S.; ROVERY, M.; DESNUELLE, P. An autolyzed and still active form of bovine trypsin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 140, p. 377–380, 1967.

MARTINS, N. F. **Purificação, caracterização e determinação da estabilidade termodinâmica de tripsinogênio e formas ativas de tripsina**. Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - Minas Gerais: Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia), 1998.

MARTINS, N. F. et al. The denaturation of alpha, beta and psi bovine trypsin at pH 3.0: evidence of intermediates. **Protein and peptide letters**, v. 10, n. 1, p. 73–81, fev. 2003.

MARTINS, N. F.; SANTORO, M. M. Partially folded intermediates during trypsinogen denaturation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 6, p. 673–82, jun. 1999.

MCDONALD, M. R.; KUNITZ, M. The effect of calcium and other ions on the autocatalytic formation of trypsin from trypsinogen. **The Journal of General Physiology**, 1941.

MERGNY, J.; LACROIX, L. Analysis of Thermal Melting Curves. **Oligonucleotides**, v. 13, p. 515–537, 2003.

MIKES, O. et al. Covalent structure of bovine trypsinogen. The position of the remaining amides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 24, n. 3, p. 346–352, 1966.

MILES, J. L. et al. Inhibition of alpha chymotrypsin by diethyl ether and Certain alcohols: a new type by of Competitive inhibition. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 4, p. 1319–1323, 1962.

MOZHAEV VADIM, V. et al. Catalytic activity and denaturation of enzymes in water organic cosolvent mixtures. **European Journal of Biochemistry**, v. 184, n. 3, p. 597–602, 1989.

NASSER BRUMANO, M. Thermodynamics of Unfolding of β -Trypsin at pH 2.8. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 382, n. 1, p. 57–62, out. 2000.

NORD, F. F.; BIER, M. On the Mechanism of Enzyme Action. LV. A study of the interaction between calcium and trypsin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 12, p. 56–66, 1953.

PACE, C. N.; BREAT A., S.; JAMES A., T. Measuring the conformational stability of a protein. In: **Protein Structure**. New York: Oxford University Press, 1990. p. 311–330.

PARTRIDGE, J.; MOORE, B. D.; HALLING, P. J. α -Chymotrypsin Stability in Aqueous-Acetonitrile Mixtures: Is the Native Enzyme Thermodynamically or kinetically Stable Under Low Water Conditions? **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 6, p. 11–20, 1999.

PATROS, E. et al. The State of Tyrosine and Phenylalanine Residues in Proteins Analyzed by Fourth-Derivative Spectrophotometry. **European Journal of Biochemistry**, v. 127, p. 117–122, 1982.

PERKINS, S. J.; WUTHRICH, K. Conformation transition from trypsinogen to trypsin, ^1H nuclear magnetic resonance at 360MHz and ring current calculation. **Journal of Molecular Biology**, v. 138, n. 1, p. 43–64, 1980.

PRIVALOV, P. L. Thermodynamic problems of protein structure. **Annual review of Biophysics and Biophysical Chemistry**, v. 18, p. 47–69, jan. 1989.

RAGONE, R. et al. Determination of tyrosine exposure in proteins by second-derivative spectroscopy. **Biochemistry**, v. 23, n. 8, p. 1871–5, 10 abr. 1984.

REICHARDT, C. **Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry** 3rd ed. Weinheim: VCH, 2003.

ROBINSON, N. C.; NEURATH, H.; WALSHY, K. A. Relation of the α -amino group of trypsin to enzyme function and zymogen activation. **Biochemistry**, v. 12, n. 3, p. 420–426, 1973.

SANCHEZ-MONTERO, J. M. et al. Modulation of lipase hydrolysis and synthesis reactions using carbohydrates. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1078, n. 3, p. 345–50, 12 jul. 1991.

SANTOS, A M. C. et al. Physical-chemical characterization and stability study of alpha-trypsin at pH 3.0 by differential scanning calorimetry. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 3, p. 278–84, 1 abr. 2008a.

SANTOS, A. M. C. et al. Improved Purification Process of β - and α -Trypsin Isoforms by Ion-Exchange Chromatography. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 51, n. 4, p. 711–721, 2008b.

SCHMID, F. Biological Macromolecules: Spectrophotometry Concentrations. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–4, 2001.

SCHROEDER, D. D.; SHAW, E. Chromatography of Trypsin and Its Derivatives : characterization of a new active form of bovine of Trypsin. **The Journal of Biological Chemistry**, 1968.

SINGER, S. J. **Advances in Protein Chemistry**. New York: Academic Press, 1962.

STAHL, M. et al. Induced Stereoselectivity and Substrate Selectivity of Bio-Imprinted alpha-Chymotrypsin in Anhydrous Organic Media. **Journal of American Chemical Society**, v. 113, n. 4, p. 9366–9368, 1991.

TAMURA, A.; PRIVALOV, P. L. The entropy cost of protein association. **Journal of Molecular Biology**, v. 273, n. 5, p. 1048–60, nov. 1997.

TAREK, M.; TOBIAS, D. J. The dynamics of protein hydration water: a quantitative comparison of molecular dynamics simulations and neutron-scattering experiments. **Biophysical Journal**, v. 79, n. 6, p. 3244–3257, 2000.

TEIXEIRA, A. E. **Purificação e caracterização de uma nova forma ativa de tripsina**. Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - Minas Gerais: Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia), 1977.

TIMASHEFF, S. N. Protein-Solvent Interactions and Protein Conformation. **Accounts of Chemical Research**, v. 3, p. 62–68, 1968.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 531-533, 2013.

VOLKIN, D. B. et al. Enzyme thermoinactivation in anhydrous organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 9, p. 843–853, 1991.

VULFSON, E. N.; SARNEY, D. B.; LAW, B. A. Enhancement of subtilisin-catalysed interesterification in organic solvents by ultrasound irradiation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n. 2, p. 123–126, fev. 1991.

WALSH, K. A.; NEURATH, H. Trypsinogen and chymotrypsinogen as homologous proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 52, p. 884–889, 1964.

WALSH, K. A.; WILCOX, P. E. Serine protease. In: **Method. Enzymol.** 19. ed. p. 31–41, 1971

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. Enzyme steady-state kinetics. 7th ed. New York: Cambridge University Press. p.588-591.